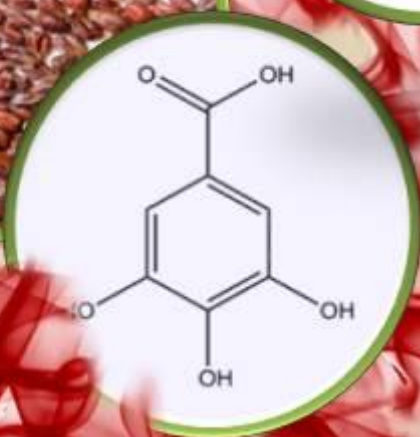


Estudio integral de la uva (Vitis vinifera L.) como fuente de compuestos fenólicos biodisponibles con acción biológica

Comprehensive study of the grape (Vitis vinifera L.) as a source of bioavailable phenolic compounds with biological activity



Juan Antonio Nieto Fuentes
TESIS DOCTORAL
Madrid, Julio 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)



**ESTUDIO INTEGRAL DE LA UVA (*Vitis vinifera* L.) COMO
FUENTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS BIODISPONIBLES CON
ACCIÓN BIOLÓGICA**

**COMPREHENSIVE STUDY OF THE GRAPE (*Vitis vinifera* L.) AS
A SOURCE OF BIOAVAILABLE PHENOLIC COMPOUNDS WITH
BIOLOGICAL ACTIVITY**

Juan Antonio Nieto Fuentes

Tesis Doctoral

Madrid, Julio de 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)

**ESTUDIO INTEGRAL DE LA UVA (*Vitis vinifera* L.) COMO
FUENTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS BIODISPONIBLES CON
ACCIÓN BIOLÓGICA**

**COMPREHENSIVE STUDY OF THE GRAPE (*Vitis vinifera* L.) AS
A SOURCE OF BIOAVAILABLE PHENOLIC COMPOUNDS WITH
BIOLOGICAL ACTIVITY**

Memoria presentada por:

Juan Antonio Nieto Fuentes

Para optar al grado de

Doctor en Ciencia y Tecnología de los alimentos e Ingeniería Química

Mención Europea

Trabajo realizado bajo la dirección de

Dra. Laura Jaime de Pablo

Dra. Susana Santoyo Díez

(Universidad Autónoma de Madrid)

DÑA. LAURA JAIME DE PABLO, PROFESORA TITULAR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, Y DÑA. SUSANA SANTOYO DíEZ, PROFESORA TITULAR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

CERTIFICAN,

Que el presente trabajo titulado **“Estudio integral de la uva (*Vitis vinifera* L.) como fuente de compuestos fenólicos biodisponibles con acción biológica (*Comprehensive study of the grape (Vitis vinifera L.) as a source of bioavailable phenolic compounds with biological activity*)”**, y que constituye la memoria que presenta Don Juan Antonio Nieto Fuentes para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos e Ingeniería Química, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) y la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste firman el presente informe en Madrid a 8 de Junio de 2015.

Fdo. Dña Laura Jaime de Pablo

Fdo. Dña Susana Santoyo Díez

A mis padres, que me lo han dado todo

*A os meus amigos, porque os amigos são
a família que escolhemos*

Solo hay dos errores que uno puede cometer en el camino hacia la verdad;

no recorrer todo el camino y no empezar

“Buda”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Guillermo Reglero Rada el haberme brindado la oportunidad de iniciar mi carrera investigadora y formarme profesionalmente en el Grupo de Investigación de Ingredientes Alimentarios Funcionales de la Universidad Autónoma de Madrid. Asimismo, gracias por su atención, amabilidad y disponibilidad en estos años.

Agradecer también a quienes me han llevado de la mano en todo este proceso, mis directoras de tesis doctoral la Dra. Laura Jaime de Pablo y la Dra. Susana Santoyo Díez. Gracias por haberme concedido la oportunidad de adquirir un magnífico aprendizaje científico, por todas las metodologías que he aprendido, tan diversas e interesantes, a la par que útiles, y por el rigor que me habéis inculcado. Igualmente, gracias por la oportunidad de haber podido realizar a vuestro cargo una inmensa producción científica, por haberme permitido la oportunidad de participar en tantos proyectos y Congresos que hoy engrosan, gracias a vosotras, mi curriculum de un modo notable. Simplemente, gracias por la calidad aprendida y por vuestra disponibilidad, en especial durante esta complicada etapa final que tanto cuesta a un doctorando.

Es imprescindible agradecer al personal del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) por su amabilidad diaria y profesionalidad, en especial a su directora, M^a Victoria Moreno.

Quisiera agradecer ampliamente a la Universidad Autónoma de Madrid, la Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación y el Catedrático Guillermo Reglero Rada no solo el haberme dado la oportunidad de compartir con ellos estos años, sino también la oportunidad de haber participado como Docente, lo que para mi ha sido sin duda, una de las mejores experiencias que tendré nunca. Estos cinco años como Profeso Ayudante no Doctor me han hecho crecer como profesional y como persona. Tengo muy claro hacia donde quiero encaminar mi futuro.

Ahora que se acaba esta etapa, es lógico echar la vista atrás, al inicio. Entonces te das cuenta de que en una tesis es tan importante el factor profesional como el personal. Y cuando hago esto, me doy cuenta de lo afortunado que he sido, porque estos años han estado llenos de muy buenos momentos (con sus complicaciones, como sucede para con todo el mundo). Y todo ello se debe, tanto a gente maravillosa que siempre ha estado a

mi lado, como a la enorme cantidad de gente nueva que decide apostar por ti como persona y acompañarte un ratito, o buen rato, en este trocito de camino. La lista es enorme, por eso, y apesarse de que parezca mentira, me veo forzado a tener que resumirla. Por ello, para no dejarme a nadie fuera del tintero, agradecer a todos mis compañeros del CIAL, tanto de la UAM como a los Foodomics y gente de otros grupos con los que cada día conversas o te ríes. Porque lo mejor de estos años ha sido el tiempo compartido con vosotros en charlas, cafés, meriendas, quedadas... GRACIAS!! Así que, disculparme si no menciono a todo el mundo de un modo específico.

Quisiera empezar por TODOS mis Nutris y Agregados, gracias por acompañarme todos estos años y por permitirme sentir que de un modo u otro, estáis ahí. En especial, quisiera agradecer a Sofía, por esa conexión que siempre hemos tenido y tendremos, porque eres mi Ying, o Yang, o no sé como es. A Marcos, porque tienes el don de escribirme un “¿Qué tal estás?” cuando más lo necesito porque sufro como Geno, y a More, que recuperarte ha sido de las mejores cosas, por hacerme sentir querido y muchas veces comprendido e incluso conectado. A Marta e Inma, que me sacáis fácilmente una sonrisa, a Plátano (o Gema), porque se te echa de menos, de verdad, y gracias por tu apresurada ayuda, y a Fran por el tiempo compartido. Y como no, a Julia, porque estar a tu lado siempre me hace sentir bien y tranquilo.

A Manu que siempre has estado ahí, y como no, a Peter David Grandson Ups, que siempre te llevo conmigo. Espero que me estés viendo en este gran día para mí.

A Alejandro, porque este año sin ti no hubiera sido lo mismo, tú me entenderás.

De la UAM me gustaría agradecer especialmente a Mayka, por lo asquerosamente parecidos que somos a veces, por todo lo que me has aportado y he crecido contigo, por ser más que una compañera para finalmente ser una excelente amiga. A Albicar, que ojala y se me contagiara tu buen rollo, a Piticli (Erika) que eres un puntazo, a Anne Ech, por el salero que daban tus locuras, a Inés, porque tanto amor incondicional es imposible de encontrar, a Mariana, por compartir mi absurdez, a Alexis, que eres una caja de sorpresas en el buen sentido, a Marisol, que apareciste en un momento clave, por lo que creo que no podría invitarte nunca a suficientes “relaxing cups of café con leche” que pudieran compensarlo. A los pitinguillos, He-Man (Gloria) y Disperso (Javi), porque aunque breve, ha sido muy intenso, unos meses que nunca se olvidarán. A todos ellos, no perdáis vuestra alegría, os merecís OI POINTS!!. Y en especial, a David Villanueva,

que mucho camino hemos recorrido juntos ya, muchas conversaciones, que siempre has estado ahí para escucharme, para aconsejarme, animarme y ayudarme, por hacerme reír y ser un excelente compañero, de ti no se puede pedir más. Por mi parte, te llevas una merecida insignia de amigo.

Quisiera agradecer además, a la Doctora Cristina Soler, con quien me hizo sentir válido el tiempo que tuve el honor de ser tutorizado a su cargo y a la Doctora Diana Martín, porque has demostrado que eres tan profesional como humana.

Para todos los Foodomics solo tengo buenas palabras y opiniones, pero sin duda a Lidia tengo que agradecer lo bien que me has hecho sentir siempre, por el cariño que me has dado, espero que por mi parte recibieras lo mismo, y a Andrea, para que no pierdas esa frescura y permitas a la gente seguir disfrutándola. En cuanto a Peppe, solo te diré que cuando alguien deja huella como tú lo has hecho en nosotros, es por algo. Finalmente, agradecer a mi “nueva mamá” Joanna, por llenarme todos los días con un poquito de entusiasmo y de Polonia, para que esta amistad no desaparezca. Y a Chiclomache.

Agradeço a todas as pessoas do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária de Portugal INIAV-Dois Portos, pela oportunidade concedida de ter feito um estágio curto onde tenho aprendido algumas técnicas importantes e pela sua amigável acogida, são todos gente fantástica. Agradeço especialmente à Donha Otilia que tanto se esforçou me ensinar português e cuidar-me tanto, à Marta de Sá, pela sua amizade e dedicação (eu também gosto muito de ti), e ter inventado o base-balão, ao Sun pela sua simpatia, atenção e dedicação, à Donha Sara pela sua simpatia (se calhar ainda lembra-se da minha opinião do bacalhão da Donha Edviges) e por ter aceito. E para João Brasão, desejo que tua simpatia nunca fique a se apagar, obrigado imenso.

E agradecer ao meu grupo de Portugal, Alessia, Murilo, Betlém, José, Cristina e todos os brasileiros. Especialmente à Betlém, por todas as graças, as piadas parvas que ainda me fazem de reír (sapatos de crocodilo?), os pequenos almoços dos domingos, videos de terror, e simplesmente, porque sem ti não teria sido o mesmo. Ao Murilo, porque tu és mais que um amigo, és meu irmãozinho, fica a saber que eu sempre vou estar acá. E para Alessia, que é impossível não te querer, eu adoro. Obrigado a todos por este imensamente maravilhoso pedacinho de vida que eu nunca vou esquecer. OBRIGADO E CHEIO DE SAUDADES!!! E para o Hugo e a Ana Pastor, que me ensinaram que siempre há mais para melhorar, que sempre há mais para aprender.

ÍNDICE GENERAL

Lista de abreviaturas	I
Resumen/Summary	V
Objetivos/Objectives	XI
Plan de trabajo	XVIII
 1. INTRODUCCIÓN	 1
1.1. Alimentos con propiedades saludables	3
1.1.1. <i>Diseño de alimentos con propiedades saludables.</i>	5
1.2. Compuestos fenólicos como ingredientes con propiedades saludables	8
1.2.1. <i>Clasificación de compuestos fenólicos</i>	9
1.2.2. <i>Actividades biológicas asociadas a los compuestos fenólicos</i>	13
1.2.2.1. <i>Actividad antioxidante</i>	13
1.2.2.2. <i>Actividad antiinflamatoria</i>	16
1.2.2.3. <i>Otras actividades</i>	18
1.2.3. <i>Fuentes naturales de compuestos fenólicos</i>	20
1.3. La uva como fuente de compuestos fenólicos	23
1.4. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos presentes en la uva	26
1.5. Extracción de compuestos fenólicos mediante tecnologías limpias	29
1.5.1. <i>Extracción con fluidos presurizados</i>	30
 2. MATERIALES Y MÉTODOS	 35
2.1. Obtención de extractos	37
2.1.1. <i>Extractos procedentes de uvas</i>	37
2.1.2. <i>Extractos procedentes de subproductos de la vinificación</i>	38
2.1.2.1. <i>Preparación de la materia prima</i>	38
2.1.2.2. <i>Extracción mediante fluidos presurizados (PLE)</i>	39
2.1.2.3. <i>Extractos enriquecidos en compuestos fenólicos monoméricos</i>	42
2.2. Caracterización de compuestos fenólicos	42
2.2.1. <i>Determinación de compuestos fenólicos totales (TPC)</i>	42
2.2.2. <i>Análisis de la composición fenólica mediante HPLC-RP-DAD</i>	43
2.2.3. <i>Análisis de la composición fenólica mediante HPLC-NP-DAD</i>	44

2.2.4. Determinación de procianidinas poliméricas	45
2.2.4.1. Determinación del grado de polimerización de la fracción de procianidinas	46
2.2.5. Determinación del porcentaje de color polimérico de antocianos	47
2.3. Determinación de la actividad antioxidante	48
2.3.1. Método del radical ABTS ^{•+}	48
2.3.2. Método del radical DPPH [•]	48
2.3.3. Método de ORAC	49
2.4. Determinación de la actividad antiinflamatoria	49
2.4.1. Cultivos celulares.	49
2.4.2. Ensayos de citotoxicidad	50
2.4.3. Medida de la actividad antiinflamatoria.	51
2.4.4. Ensayo de ELISA para la cuantificación de citoquinas	52
2.5. Biodisponibilidad in vitro	53
2.5.1. Digestión in vitro	53
2.5.1.1. Extractos de uva	53
2.5.1.2. Extractos de PLE	53
2.5.2. Absorción intestinal in vitro	54
2.6. Análisis estadístico	57
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
3.1. Uvas	61
3.1.1. Caracterización de extractos de variedades de uva blanca	62
3.1.1.1. Medida de la actividad antioxidante	62
3.1.1.2. Determinación de compuestos fenólicos	66
3.1.2. Caracterización de extractos de variedades de uva tinta	71
3.1.2.1. Medida de la actividad antioxidante	71
3.1.2.2. Determinación de compuestos fenólicos	76
3.1.3. Correlación entre la actividad antioxidante y la medida de TPC	81
3.1.4. Caracterización de los extractos	83

3.1.5. Biodisponibilidad	86
<i>3.1.5.1. Biodisponibilidad de extractos etanólicos de uva blanca</i>	86
<i>3.1.5.1.1. Digestión in vitro</i>	87
<i>3.1.5.1.2. Absorción intestinal</i>	90
<i>3.1.5.2. Biodisponibilidad de extractos etanólicos de uva tinta</i>	90
<i>3.1.5.2.1. Digestión in vitro</i>	91
<i>3.1.5.2.2. Absorción intestinal</i>	94
3.2. Raspón	98
3.2.1. Extracción PLE de raspón	98
<i>3.2.1.1. Rendimiento, TPC, valor TEAC</i>	100
<i>3.2.1.2. Oligómeros y polímeros</i>	101
<i>3.2.1.3. Correlación entre variables dependientes.</i>	104
3.2.2. Caracterización del extracto óptimo de raspón.	106
<i>3.2.2.1. Caracterización química</i>	106
<i>3.2.2.2. Caracterización funcional</i>	110
<i>3.2.2.3. Biosdisponibilidad</i>	115
<i>3.2.2.3.1. Digestión in vitro</i>	115
<i>3.2.2.3.2. Absorción intestinal</i>	120
3.2.3. Obtención y caracterización de un extracto enriquecido en monómeros	124
<i>3.2.3.1. Caracterización química</i>	127
<i>3.2.3.2. Caracterización funcional</i>	128
<i>3.2.3.3. Biodisponibilidad</i>	129
<i>3.2.3.3.1. Digestión in vitro</i>	129
<i>3.2.3.3.2. Absorción intestinal</i>	133
3.3. Pepitas	138
3.3.1. Extracción PLE de pepitas	138
<i>3.3.1.1. Rendimiento, TPC, valor TEAC</i>	139
<i>3.3.1.2. Oligómeros y polímeros</i>	142
<i>3.3.1.3. Correlación entre variables dependientes</i>	145

3.3.2. Caracterización del extracto óptimo de pepitas	146
<i>3.3.2.1. Caracterización química</i>	147
<i>3.3.2.2. Caracterización funcional</i>	150
<i>3.3.2.3. Biodisponibilidad</i>	155
<i>3.3.2.3.1. Digestión in vitro</i>	155
<i>3.3.2.3.2. Absorción intestinal</i>	158
3.3.3. Obtención y caracterización de un extracto enriquecido en monómeros	162
<i>3.3.3.1. Caracterización química y funcional</i>	164
<i>3.3.3.2. Biodisponibilidad</i>	165
<i>3.3.3.2.1. Digestión in vitro</i>	165
<i>3.3.3.3.2. Absorción intestinal</i>	167
3.4 Hollejos	170
3.4.1. Desazucarado de los hollejos	170
3.4.2. Extracción PLE de hollejos	170
3.4.3. Caracterización del extracto de hollejos	173
<i>3.4.3.1. Caracterización química</i>	173
<i>3.4.3.2. Biodisponibilidad</i>	176
<i>3.4.3.2.1. Digestión in vitro</i>	176
<i>3.4.3.2.2. Absorción intestinal</i>	179
3.4.4. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos a partir de subproductos de la uva	181
4. CONCLUSIONES	185
5. BIBLIOGRAFÍA	191
Anexos	215

Lista de abreviaturas

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
Caco-2	Línea celular de adenocarcinoma de colon
COX-2	Ciclooxigenasa tipo 2
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
ELISA	Enzimoimmunoensayo
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GRAS	Generalmente Reconocido como Seguro
HPLC-RP-DAD	Cromatografía de líquidos (fase reversa) con detector de haz de diodos
HPLC-RP-DAD	Cromatografía de líquidos (fase normal) con detector de haz de diodos
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular tipo 1
IL	Interleuquina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDL_{ox}	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MAE	Extracción asistida por microondas
MDA	Malonaldehído
MLR	Regresión lineal múltiple
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ol)-2,5-difeniltetrazolio
NF-κB	Factor de transcripción nuclear κB
NO	Óxido nítrico

ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
PA	Proantocianidinas
PMA	12-miristato, 13-acetato de forbol
PGE	Prostaglandina E
PLE	Extracción con líquidos presurizados
RAW	Línea celular de macrófagos de ratón con leucemia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SLE	Extracción sólido-líquido
STAT	Señales transductoras y activadoras de la transcripción
TBARS	Sustancias reactivas del ácido barbitúrico
TEAC	Actividad antioxidante en equivalentes de trolox
TEER	Potencial transmembrana
THP-1	Línea celular de monocitos de leucemia mieloide aguda
TNF-α	Factor de necrosistumoral α
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
TPC	Contenido total en compuestos fenólicos
UAE	Extracción asistida por ultrasonidos
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular

Resumen/Summary

Resumen

En la presente memoria se recoge el trabajo y los resultados más relevantes obtenidos durante la investigación llevada a cabo para optar al título de Doctor. El objetivo ha sido contribuir al campo de los alimentos con propiedades saludables, estudiando las características de extractos naturales obtenidos a partir de subproductos de la vinificación, mediante tecnologías avanzadas y respetuosas con el medio ambiente. Además de llevar a cabo un estudio sobre la variedad de uva más adecuada para la elaboración de vinos o bebidas derivadas ricos en antioxidantes.

Así, se llevó a cabo el estudio de 26 variedades de uva, 10 blancas y 16 tintas, recogidas en la misma área geográfica. Se usaron dos tipos de extractos, uno obtenido por extracción directa del mosto que simulará a los vinos blancos, y otro obtenido mediante un proceso de maceración acelerada capaz de simular a los vinos tintos o blancos con maceración pelicular. En todos estos extractos se midió por un lado, su contenido fenólico y por el otro, su actividad antioxidante, estudiándose la biodisponibilidad de los que presentaron los mejores resultados. Así, de todos los extractos estudiados, los que mostraron una mayor actividad fueron los etanólicos, destacando en las uvas blancas el extracto de Viognier, mientras que en las uvas tintas fueron los correspondientes a Tannat, Merlot y Garró. El estudio de la biodisponibilidad de estos cuatro extractos reveló que la fracción biodisponible del extracto de Tannat era la que poseía una mayor actividad antioxidante, debida principalmente a la presencia de ácidos fenólicos y flavonoles.

La obtención de extractos de los diferentes subproductos de la vinificación: raspones, pepitas y hollejos se llevó a cabo mediante la extracción por fluidos presurizados (PLE), combinado con mezclas de agua y etanol para realizar procesos de extracción respetuosos con el medio ambiente. Para cada tipo de subproducto se evaluaron las condiciones de extracción óptimas para la obtención de extractos con una elevada actividad antioxidante mediante un diseño experimental. Para cada tipo de matriz, se obtuvieron condiciones de extracción óptimas diferentes, siendo de 120 °C, 10 minutos y con un 30 % de etanol para el raspón y de 20 °C, 11 minutos y 75 % de etanol para las pepitas. Los datos obtenidos para los hollejos no se ajustaron al modelo propuesto, eligiéndose para el estudio un extracto con un elevado contenido en compuestos fenólicos y reducido en polímeros fenólicos (56 °C, 9 minutos y 20 % de etanol). El

estudio de la biodisponibilidad de estos extractos, reveló que durante la digestión se produce una importante disminución de la actividad antioxidante, la cual es debida principalmente, a la pérdida de polímeros fenólicos. Tras el proceso de absorción intestinal, el extracto que proporcionó un mayor contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante a la fracción biodisponible fue el de pepitas.

Con el objetivo de incrementar el contenido de monómeros y oligómeros biodisponibles en el extracto, los extractos óptimos de raspón y pepitas se sometieron a un proceso de ultrafiltración por membranas de 10 KDa. El estudio de la biodisponibilidad de los permeados indicó que durante el proceso digestivo no se produjeron pérdidas significativas de compuestos fenólicos para estas muestras. Sin embargo, tan solo el permeado de pepitas dio lugar a un aumento de la actividad antioxidante y la cantidad de compuestos fenólicos de la fracción biodisponible, con respecto a su extracto óptimo de partida.

Además, para el raspón se estudió la biodisponibilidad de un extracto que presentaba un elevado contenido en monómeros y bajo en polímeros (80 °C, 6 minutos y 100 % de etanol) obtenido durante el diseño experimental. La fracción biodisponible de dicho extracto presentó una actividad antioxidante superior a la encontrada para el óptimo de raspón y su permeado.

De esta manera, se demuestra que la composición fenólica de los vinos está muy ligada a la variedad, siendo la variedad Viognier la más adecuada para la elaboración de vinos blancos con un elevado contenido fenólico y para vinos tintos Tannat, Merlot y Garró. Además, se corrobora que los subproductos de la vinificación suponen una fuente importante de compuestos fenólicos biodisponibles, siendo los más adecuados de cara a la formulación de alimentos enriquecidos en compuestos fenólicos bioactivos el permeado de pepitas y el extracto etanólico de raspón.

Summary

This report describes the scientific methodology and the most relevant results obtained during the experimental training period required to obtain the PhD degree. The aim of this work was to investigate the potential development of specific products with beneficial health properties by studying the biological properties of natural extracts from winery by-products using advanced green technologies. Additionally a research was carried out to determine which wine grape variety was most appropriate in order to obtain wines or functional beverages with high antioxidant content.

26 wine grape varieties (10 white and 16 red), harvested from the same crops, were analysed. Two different extracts were used: one obtained directly from pressed must, which can be used to simulate white monovarietal wines, and another with 12% ethanol, which can be used to simulate red wine or white wines with prefermentative maceration. The antioxidant activity and total phenolic content were determined for all extracts, meanwhile the bioavailability studies were only carried out for those extracts which presented the highest antioxidant activity. Thus, 12% ethanolic extracts showed the highest antioxidant activity, standing out Viognier extracts among the white varieties and Tannat, Merlot and Garró among the red ones. The bioavailability studies of these 4 extracts indicated that bioavailable fraction from Tannat showed the highest antioxidant level, due to the presence of phenolic acids and flavonols.

Extracts from different wine grape by-products, stem, seed and skin, were obtained by pressurized liquid extraction (PLE) using water-ethanol mixtures to ensure a green extraction process. The optimal extraction conditions for each by-product were determined in order to obtain extracts with high antioxidant properties, and for this purpose an experimental design was used. Different optimal conditions were obtained for each matrix type, being 120 °C, 10 minutes and 30% ethanol for the stem sample and 20 °C, 11 minutes and 75% ethanol for the seeds. Data obtained for grape skin did not meet the required standard, so an extraction with a high content of phenolic compounds but with few polymers was chosen (56 °C, 9 minutes and 20% ethanol). The bioavailability studies of all these extracts indicated that digestion process reduced the antioxidant capacity of the extracts, mainly due to an important loss of polymeric compounds. Later intestinal absorption assays showed that bioavailable fraction

obtained from grape seed extracts presented the highest phenolic content and antioxidant activity.

In order to increase the monomeric and oligomeric phenolic levels in the PLE stem and seed extracts, an ultrafiltration process with 10-KDa membranes was used. The bioavailability studies carried out with the obtained permeates, showed no significant losses of phenolic compounds during the digestion process. However, the grape seed permeate was the only sample able to increase the antioxidant activity and phenolic content of the bioavailable fraction when compared with the grape original extract.

Furthermore, an ethanolic PLE stem extract, characterized by a high monomeric and low polymeric content (80 °C, 6 minutes and 100% ethanol) was subjected to bioavailability studies. The bioavailable fraction of this extract showed higher antioxidant properties compared with those presented by the optimal stem extract and its permeate.

Consequently, these results showed that wine phenolic composition was highly conditioned by grape variety, being Viognier the most adequate variety to produce high phenolic white wines, while Tannat, Merlot and Garró were the best varieties to obtain high phenolic red wines. It was also indicated that wine by-products were important sources of bioavailable phenolic compounds. In this case, grape seed permeate and stem ethanolic extract were the most suitable extracts to formulate food products enriched with bioactive phenols.

Objetivos/Objectives

Objetivos

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es contribuir al desarrollo de alimentos con propiedades saludables, estudiando el potencial de la uva como fuente de compuestos fenólicos funcionales y biodisponibles.

Para la consecución del objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- 1) Conocer la influencia de la variedad de uva respecto a la obtención de compuestos fenólicos antioxidantes, estudiando la biodisponibilidad de dichos compuestos en aquellas variedades que presenten un mayor potencial.
- 2) Determinar las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos bioactivos a partir de subproductos de la vinificación (raspón, pepitas y hollejo).
- 3) Analizar la composición de los extractos obtenidos en las condiciones óptimas, determinando su actividad antioxidante y antiinflamatoria, así como la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos presentes en estos extractos.
- 4) Estudiar la influencia, sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, del grado de polimerización de la matriz fenólica.

Objectives

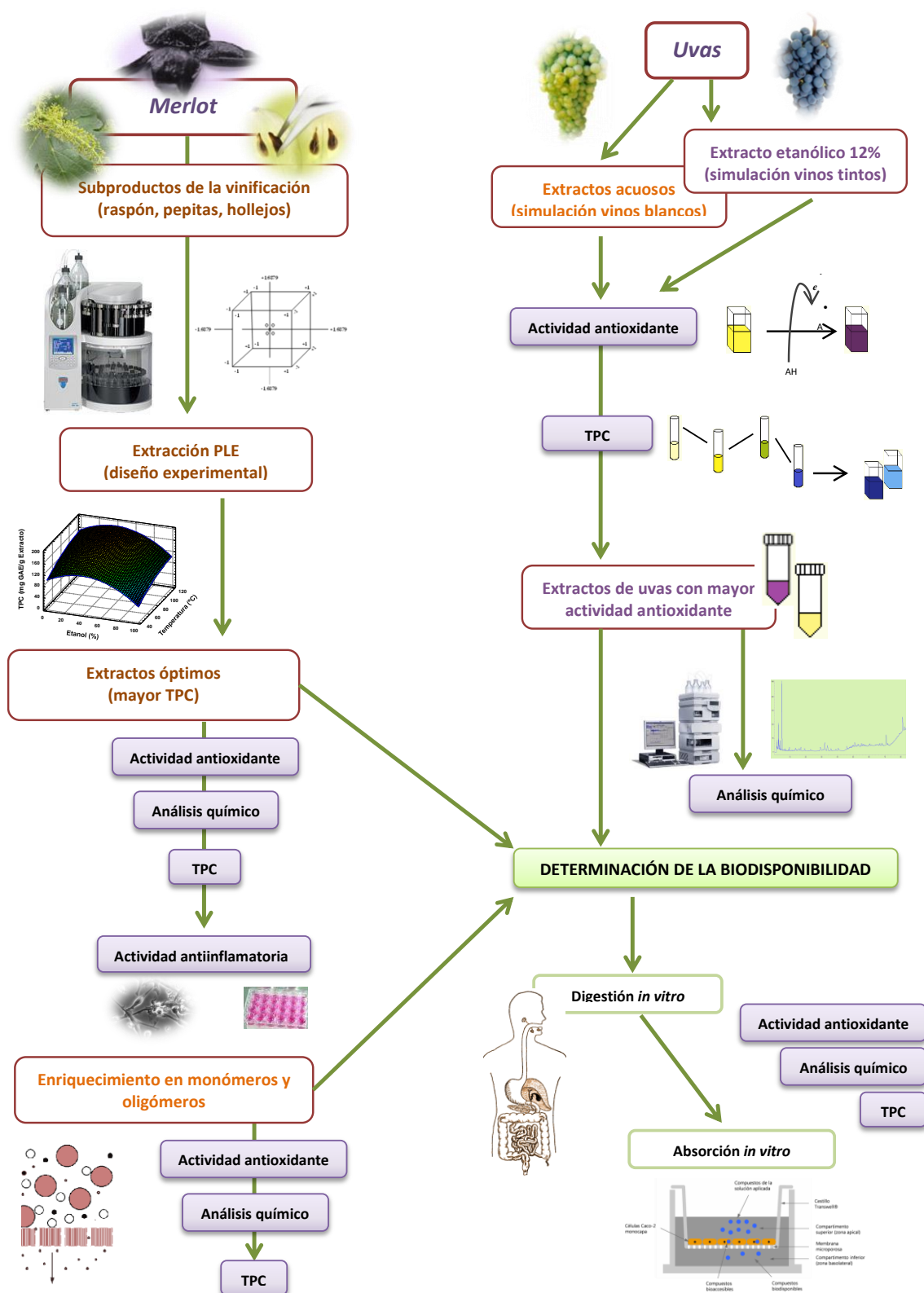
The aim of this PhD thesis is to contribute to the development of foods with health claims, studying the potential of the grape as a source of functional and bioavailable phenolic compounds.

In order to achieve the overall objective, the following partial objectives were established:

- 1) To determine the influence of grape variety in the achievement of antioxidant phenolic compounds, studying its bioavailability in those varieties presented a highest potential.
- 2) To ascertain the optimal extraction conditions in order to obtain bioactive phenolic compounds from winemaking by-products (stem, seed and skin).
- 3) To analyze the composition of the extracts obtained in optimal conditions, determining its antioxidant and anti-inflammatory activity, as well the bioavailability of the phenolic compounds presented in these extracts.
- 4) To study the influence of phenolic polymerization degree on phenolic compounds bioavailability.

Plan de trabajo

El plan de trabajo que se ha seguido en la presente investigación consta de varias etapas, según se presenta en la siguiente figura:



En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de la composición fenólica de 26 variedades de uva con objeto de seleccionar las más adecuadas para el desarrollo de bebidas antioxidantes funcionales. Para ello se realizaron dos tipos de extractos, uno obtenido por extracción directa del mosto y otro, mediante un proceso de maceración acelerada con etanol al 12 %, estudiándose su actividad antioxidante y cantidad de compuestos fenólicos totales. A continuación se analizó la composición y se evaluó la biodisponibilidad “in vitro” de las variedades con mayor potencial. La evaluación de la biodisponibilidad se llevó a cabo mediante una digestión seguida de un proceso de absorción intestinal mediante el uso de la línea celular Caco-2.

Por otro lado, se estudiaron los subproductos de la vinificación (raspón, hollejos y pepitas) como fuentes de compuestos fenólicos. Para ello, se llevaron a cabo extracciones empleando la técnica de extracción con líquidos presurizados (PLE). Las condiciones óptimas de extracción con respecto al contenido en compuestos fenólicos de los extractos y su actividad antioxidante se determinaron mediante la aplicación de un diseño experimental.

Una vez determinados los extractos óptimos, se analizó su composición fenólica, su actividad antioxidante, su TPC y su actividad antiinflamatoria. También se estudió la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos antioxidantes presentes en estas muestras.

Asimismo, se aplicó un proceso de enriquecimiento en monómeros y oligómeros de los extractos PLE obtenidos mediante el uso de membranas de ultrafiltración (10 kDa), estudiando cómo este cambio en la composición de la matriz podía afectar a la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos antioxidantes.



1

INTRODUCCIÓN

1.1. Alimentos con propiedades saludables.

Existen numerosas evidencias científicas que ponen de manifiesto la existencia de compuestos con efectos beneficiosos para la salud en muchos alimentos comunes de la dieta, tales como frutas, verduras, pescados, productos lácteos y cereales, entre otros. Sin embargo, el estilo de vida de la población actual impide, en muchas ocasiones, el cumplimiento de las pautas nutricionales recomendadas, aumentando así el riesgo de padecer ciertas enfermedades relacionadas con una nutrición inadecuada. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades no transmisibles son responsables de un elevado número de muertes en todo el mundo y existe un aumento en su incidencia, representadas principalmente por las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, junto con otras como la diabetes y las enfermedades respiratorias. Entre los factores no genéticos desencadenantes de dichas enfermedades se encuentran el consumo de tabaco, el envejecimiento y una alimentación inadecuada. Esta última puede dar lugar, entre otros, a un aumento de glucosa en sangre, hiperlipidemia, tensión arterial elevada u obesidad.

En las últimas décadas, el perfil de los consumidores ha cambiado considerablemente, caracterizándose dicho cambio por la aceptación progresiva del binomio alimentación y salud, esto es, la dieta tiene un efecto directo sobre la salud. Actualmente, los alimentos no se entienden tan solo como productos para satisfacer el hambre y las necesidades nutricionales, sino también como productos con capacidad de prevenir ciertas enfermedades asociadas a la nutrición, así como para mejorar el bienestar físico y mental. En este sentido, los alimentos con propiedades saludables (también denominados alimentos funcionales o alimentos de uso específico para la salud) han experimentado un incremento en su demanda por parte de los consumidores (Siró y col., 2008).

El interés por los alimentos diseñados específicamente para contribuir de manera beneficiosa a algún aspecto concreto de la salud tiene su origen en Japón durante la década de los años 80, donde surgieron como una medida para mejorar la salud de la población (castigada tras la II Guerra Mundial) y el rápido aumento de los costes sanitarios (Arai, 1996). En el año 1984 Japón utilizó por primera vez el término “alimento funcional”, impulsando un proyecto nacional para el desarrollo de este tipo de alimentos. Sin embargo, no sería hasta 1991 cuando este país emitiera un decreto en el

que se aprobaba la denominación de los alimentos de uso específico para la salud, caracterizados como FOSHU (*Foods for Specified Health Use*). Esta denominación incluye a aquellos alimentos que se pueden usar para mejorar la salud de las personas y cuyo efecto específico sobre ellas se puede alegar como un valor añadido (Ohama y col., 2006).

A partir del interés del gobierno japonés y de las evidencias existentes sobre el binomio alimentación y salud, otros gobiernos del mundo, como los de Estados Unidos de Norteamérica y Europa, experimentaron un creciente interés en este tipo de alimentos.

Históricamente, el mayor problema relativo a estos alimentos con el que se ha encontrado Europa ha sido las diferencias legislativas entre países con respecto a la regulación de la información nutricional y el tipo de declaraciones saludables que podían asociarse a un producto. Esta situación inició un cambio tras un primer intento de armonización, donde se prohibieron las declaraciones relativas a prevención, tratamiento o cura por parte de un alimento (*European Parliament and Council of Europe, 2000*). Así, el 16 de Julio de 2003 la Comisión Europea propuso una nueva regulación que armonizara las declaraciones nutricionales y saludables en los alimentos, incluyendo los suplementos nutricionales, con una versión final de la nueva legislación aprobada a finales del año 2006, con fecha de aplicación a todos los países miembros desde 1 de julio de 2007 (Reglamento CE 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006).

Con esta nueva regulación, se reconoce a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como el organismo evaluador de las bases científicas sobre las que se pretenden sustentar las declaraciones. Así, la EFSA aprobó y publicó un listado de declaraciones permitidas, donde se hizo una distinción entre las declaraciones nutricionales y las declaraciones saludables. De este modo, la EFSA evaluaría todas las declaraciones y tan solo aquellas que estuviesen suficientemente sustentadas serían aprobadas en la UE, retirando todas las declaraciones saludables concernientes a los alimentos que no fuesen claras, concisas o no estuviesen suficientemente sustentadas desde un punto de vista científico. Como consecuencia, muchos productos fueron retirados del mercado de los alimentos con propiedades saludables (Bech-Larsen y Scholderer, 2007).

1.1.1. Diseño de alimentos con propiedades saludables.

La tendencia actual de crecimiento del mercado de alimentos con propiedades saludables ha proporcionado una oportunidad para el desarrollo de este tipo de productos (Khan y col., 2013). Así, la investigación sobre estos alimentos representa una de las áreas de investigación e innovación más interesantes para la industria alimentaria (Bigliardi y Galati, 2013). Este aspecto se hace patente al observar el número de publicaciones científicas relativas a esta área, pues al introducir las palabras clave *functional AND food* en el buscador *ISI Web of Knowledge*, encontramos 85.620 referencias, de las cuales 6.397 corresponden al año 2014.

En comparación con los grandes mercados mundiales de los alimentos con propiedades saludables (Japón y Estados Unidos de Norteamérica), el mercado europeo se encuentra menos desarrollado (Bech-Larsen y Scholderer, 2007). En Europa, los alimentos funcionales suponen un sector importante de este mercado, con Alemania, Francia, Reino Unido y Países Bajos como los principales consumidores. Cabe destacar que en Europa, este mercado es heterogéneo, existiendo grandes diferencias de aceptación y consumo entre los diferentes países, donde, en general, los relativos al norte y centro de Europa muestran una mayor aceptación que en los países del Mediterráneo, donde se consumen cantidades apreciables de alimentos frescos y saludables. En España, se estima que en el año 2020 este tipo de productos representen en torno al 40 % del total de los productos relativos a los alimentos. A pesar de estas expectativas, este tipo de productos conlleva unos costes de desarrollo estimados entre 1 y 2 millones de dólares, sin incluir los gastos de marketing necesarios para su comercialización que habitualmente son aún mayores (Siró y col., 2008).

En España, actualmente se encuentra en activo el Plan Estatal de Investigación Científica-Técnica y de Innovación (2013-2016), donde se incluye el Programa Estatal de I+D+i, entre cuyas prioridades se encuentra el desarrollo de alimentos seguros, nuevos alimentos funcionales, nutraceuticos y otros adaptados al mercado, así como técnicas para la normalización y certificación (MINECO 2013).

El diseño de alimentos con propiedades saludables requiere el establecimiento de una serie de especificaciones y requisitos que han de cumplirse. De este modo, es necesario establecer una serie de especificaciones técnicas de producto, de formulación, ingredientes, parámetros de calidad físicos-químicos, microbiológicos o reológicos, así

como especificaciones comerciales, de distribución, condiciones de consumo, presentación e imagen. En cuanto a los requisitos, su objetivo es asegurar el control de la calidad del producto, los procedimientos de producción y la validación del producto previo a su puesta en el mercado (Jones y Jew, 2007; Siró y col., 2008). Además, para el desarrollo de un alimento funcional, es necesario demostrar científicamente los efectos nutricionales o fisiológicos beneficiosos de un producto alimenticio antes de poder incluir declaraciones nutricionales o saludables, tal y como exige la normativa europea vigente (Reglamento CE 1924/2006 del Parlamento Europeo).

Con el objetivo de cumplir esta normativa, se deben realizar diversos estudios previos (Figura 1). En este sentido, para la obtención de ingredientes funcionales o con propiedades saludables es necesario en un primer momento el diseño de procesos de extracción adecuados a cada tipo de ingrediente. Una vez obtenido el ingrediente funcional, es necesaria su caracterización química y el estudio de su actividad biológica *in vitro*, determinando también su biodisponibilidad, ya sea solo o incluido en una matriz alimentaria. Tras conocer su biodisponibilidad, es necesario llevar a cabo estudios de aceptabilidad, calidad y seguridad del alimento. A continuación, se iniciarían los estudios preclínicos en animales de experimentación y posteriormente los estudios clínicos, incluyendo ensayos de proteómica y metabolómica. El cumplimiento de todas estas etapas lleva a la consecución del desarrollo de un alimento con propiedades saludables.



Figura 1. Ejemplo de estudios previos a realizar para el diseño de un alimento con propiedades saludables.

En los últimos años, se ha producido un incremento en el interés sobre la recuperación, reutilización y revalorización de subproductos industriales (Devesa-Rey y col., 2011). Este aspecto es especialmente aplicable al sector agroalimentario, donde tradicionalmente los residuos se desechaban o se utilizaban tanto para la producción de fertilizantes como en alimentación animal; sin embargo, actualmente estos subproductos se pueden recuperar y revalorizar, reduciendo a la vez la posible contaminación ambiental (Laufenberg y col., 2003). En este sentido, son numerosos los ejemplos relativos a la obtención de ingredientes funcionales a partir de subproductos de la industria agroalimentaria, principalmente de origen vegetal (Tabla 1). De esta manera, se ha estudiado su uso para la obtención de compuestos bioactivos naturales de alto valor añadido, como fibra dietética, compuestos fenólicos, vitaminas y ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA), entre otros, que cada vez resultan más atractivos para la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (González-Centeno y col., 2010; Sahpazidou y col., 2014).

Tabla 1. *Diferentes ejemplos de aprovechamiento de subproductos de la industria agroalimentaria para la obtención de ingredientes con carácter funcional.*

Residuo	Ingrediente Funcional	Autores
Pieles de cítricos	Fibra dietética/ Compuestos Fenólicos (Flavanonas)	Balasundram y col., 2006
Salvado de cereales	Esteroles / Vitaminas (tocoferoles, tocotrienoles) γ -orizanoles (esteroles y ácido ferúlico) / β -Glucanos	Naziri y col., 2014
Granos de cereales	γ -linoleico / Fibra dietética	Laufenberg y col., 2003
Remolacha azucarera	Fibra dietética	Schieber y col., 2001
Cáscara de granadas	Compuestos fenólicos (Elagitaninos)	Hollebeeck y col., 2012
Hojas de olivo	Compuestos fenólicos (Hidroxitirosol)	Naziri y col., 2014
Cáscaras de frutos secos	Compuestos Fenólicos (Taninos)	Laufenberg y col., 2003
Aguas de escaldado de vegetales	Compuestos Fenólicos (Ácidos Fenólicos)	Laufenberg y col., 2003
Hígado de tiburón	Escualeno	MAGRAMA 2012
Recortes de pescados grasos	Ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA)	MAGRAMA 2012
Caparazones de crustáceos	Quitina	MAGRAMA 2012

Respecto a la industria vitivinícola, esta genera gran cantidad de residuos, principalmente derivados de los racimos de uva. De esta manera, las principales materias de desecho que se originan durante el proceso de vinificación corresponden al raspón, las pepitas y los hollejos de uva (Figura 2). Estos subproductos representan aproximadamente un 17% respecto al peso de la uva, del cual un 8% corresponde a los hollejos, el 5% a las pepitas y el 4% al raspón, que se corresponde con la parte leñosa del racimo de uva cuyo esqueleto sirve como soporte de las bayas (Ruggieri y col., 2009; Teixeira y col., 2014).

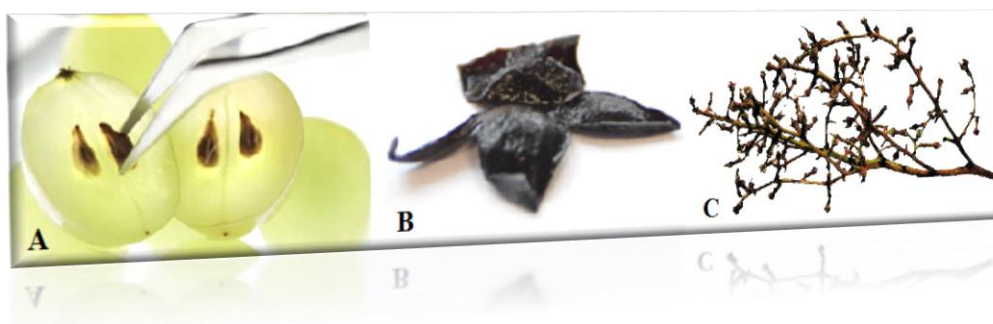


Figura 2. Principales subproductos del proceso de vinificación. (A) Pepitas, (B) Hollejos y (C) Raspón.

Tanto las pepitas como los hollejos se han venido aprovechando como materia prima en otros sectores industriales, generalmente para alimentación animal o formación de compost, aunque en los últimos años se han empezado a utilizar para la obtención de ingredientes funcionales, principalmente como fuente de fibra dietética y compuestos fenólicos. De esta manera, los hollejos y orujos del proceso de vinificación se han utilizado para la obtención de extractos ricos en antocianos y resveratrol, o de flavanoles a partir de las pepitas de uva (Teixeira y col., 2014). A diferencia de ellos, los raspones, apenas han mostrado ningún uso.

1.2. Compuestos fenólicos como ingredientes con propiedades saludables.

Los compuestos fenólicos, son un grupo de sustancias fitoquímicas presentes en las plantas, caracterizados por poseer en su estructura uno o varios anillos aromáticos unidos a uno o más grupos hidroxilo, incluyéndose también derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.

Proceden del metabolismo secundario de las plantas, en las que se sintetizan a través de la ruta del ácido shiquímico y/o del ácido malónico. Llevan a cabo una importante función fisiológica, ya que contribuyen a aumentar la resistencia al estrés ambiental

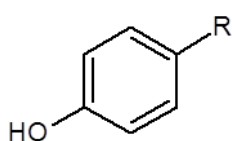
tanto abiótico como biótico de las plantas, entre otras funciones. De esta manera, las protegen frente a radiaciones UV, altas temperaturas o baja disponibilidad de agua; así como ante ataques de hongos e insectos (Manach y col., 2004; Anastasiadi y col., 2012).

1.2.1. Clasificación de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo muy amplio, donde se han llegado a identificar más de 8.000 compuestos con estructuras muy variadas. La clasificación de los compuestos fenólicos más utilizada es la que se lleva a cabo según su esqueleto carbonado, donde se pueden distinguir dos grandes grupos en función de su estructura química básica: compuestos fenólicos no flavonoideos y compuestos fenólicos flavonoideos. Además, cabe destacar que estos compuestos comúnmente se presentan asociados a monosacáridos, ácidos orgánicos u otras sustancias que confieren estabilidad a la molécula (Ribéreau-Gayon y col., 2006).

- Compuestos fenólicos no flavonoideos.

Los compuestos que pertenecen a este grupo se caracterizan por presentar un único grupo fenol, dando lugar a diferentes estructuras según los sustituyentes carbonados que presente dicho núcleo (Figura 3). Asimismo, cada sustituyente se puede presentar en forma de ácido, alcohol, cetona o aldehído bencénico. Dentro de este grupo de compuestos se distinguen principalmente dos familias por su abundancia en plantas: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos.



R	Compuesto
COOH	Ácido benzoico
CH=CH-COOH	Ácido cinámico

Figura 3. Estructura química de los compuestos fenólicos no flavonoideos

Los ácidos hidroxibenzoicos se caracterizan por contener un grupo carboxilo en el sustituyente del grupo fenol, donde los diferentes ácidos hidroxibenzoicos se distinguen según la posición que ocupen los diferentes sustituyentes hidroxilo y/o metoxilo en el anillo bencénico. Entre los ácidos hidroxibenzoicos pueden destacarse el ácido gálico, el protocatéquico, el vainílico y el sirínico.

Los ácidos hidroxicinámicos presentan la estructura común del ácido fenilpropenóico, distinguiéndose entre sí por la posición que ocupan los sustituyentes metoxilo y/o

hidroxilo en el anillo bencénico. Entre los ácidos hidroxicinámicos pueden destacarse el ácido cumárico, el cafeico, el ferúlico y el sinápico.

Además, estos compuestos se pueden presentar en forma polimerizada (taninos hidrolizables o galotaninos) formados por esterificación de ácidos hidroxibenzoicos unidos entre sí o por medio de monosacáridos, siendo frecuentes los taninos hidrolizables generados por unidades de ácido gálico (Figura 4).

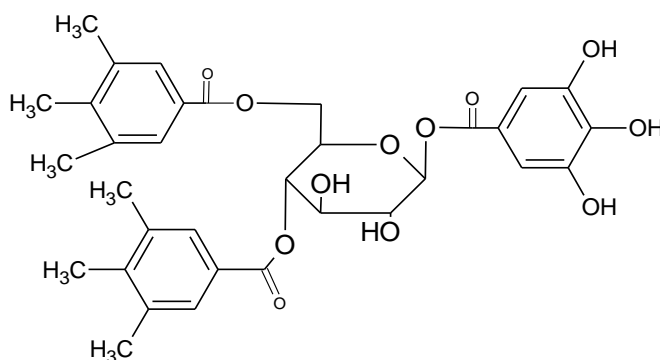


Figura 4. Representación de un tanino hidrolizable.

Por último, las moléculas de lignina son polímeros que resultan de la unión aleatoria de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumárico, coniferílico y sinápico). Dentro de los cuales, los lignanos corresponden a unidades diméricas.

Dentro de los compuestos fenólicos no flavonoideos podemos encontrar también compuestos fenólicos minoritarios, como los estilbenos. Este grupo de compuestos está caracterizado por presentar una estructura $C_6-C_2-C_6$ en sus dos posibles formas isoméricas, *cis* y *trans* (Manach y col., 2004). Entre ellos, el *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), representado en la Figura 5, es uno de los estilbenos más importantes por sus demostradas actividades biológicas (Iacopini y col., 2008). Además, pueden encontrarse también formas glucosiladas de este compuesto (piceido) u oligómeros del mismo, tales como las viniferinas (Püssa y col., 2006).

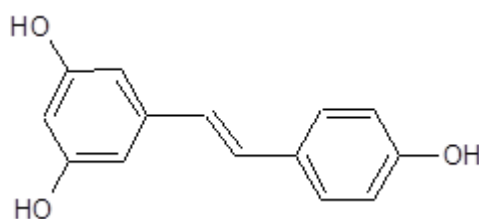


Figura 5. Estructura química de la molécula de *trans*-resveratrol.

- Compuestos fenólicos flavonoideos.

Los compuestos fenólicos flavonoideos o flavonoides constituyen el grupo más extenso de compuestos fenólicos en los vegetales. Los flavonoides comparten una estructura química común, $C_6-C_3-C_6$, formada por dos ciclos bencénicos unidos por una cadena de tres átomos de carbono, donde normalmente, estos tres átomos de carbono dan lugar a un heterociclo de oxígeno. En la Figura 6 se presenta la estructura básica común de estos compuestos. Dentro de los flavonoides, los distintos grupos difieren entre sí por el grado de oxidación y de sustitución del heterociclo. Así, según su estructura podemos clasificarlos en siete grupos diferentes: los flavonoles, flavanoles, antocianos, flavonas, isoflavonas, flavanonas y flavanonoles.

Dentro del grupo de los flavonoides también se encuentran las auronas, chalconas y las dihidrochalconas. Estos compuestos comparten la estructura general $C_6-C_3-C_6$, pero se diferencian de los anteriores en que no contienen, en general, el heterociclo de oxígeno y por tanto el anillo C se presenta de forma abierta.

Dentro de cada grupo flavonoideo, se pueden distinguir diferentes compuestos en función del número y localización de los grupos hidroxilo y/o metoxilo en los anillos fenólicos A y B (Heim y col., 2002; Manach y col., 2004)

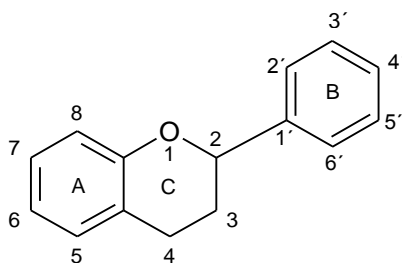


Figura 6. Estructura general de los compuestos fenólicos flavonoideos.

En la naturaleza se encuentran principalmente en forma de flavonoides 3-O-glucósidos y con mucha menor frecuencia en forma de diglucósidos (Roggero y col., 1986). Los monosacáridos a su vez, pueden estar esterificados principalmente con ácidos hidroxicinámicos.

El grupo de los flavanoles incluye a las catequinas (flavan-3-ol), leucoantocianidinas (flavan-3,4-dioles) y a los flavan-4-ol. La polimerización de las catequinas da lugar a la formación de proantocianidinas y en última instancia a taninos condensados. Las catequinas tienen el heterociclo totalmente saturado y un grupo hidroxilo en posición 3,

lo que da lugar a dos carbonos asimétricos, determinando la existencia de cuatro isómeros ópticos. Según el grado de hidroxilación del anillo B, y la orientación del OH respecto al heterociclo, se da lugar a los distintos compuestos, que se designan como catequina, galocatequina, epicatequina y epigalocatequina.

Además, los flavanoles pueden presentarse como unidades polimerizadas de los mismos. En este sentido, las proantocianidinas y taninos condensados, son polímeros de flavan-3-oles, normalmente por enlaces carbono-carbono en C₄-C₈ o por C₄-C₆. Aunque el grado de polimerización de estos compuestos no se encuentra consensuado en la bibliografía, estos compuestos forman procianidinas diméricas, triméricas y oligoméricas (Figura 7), pudiendo formar polímeros de alto grado de polimerización de hasta 31 unidades (Sun y col., 1998; Deprez y col., 2001; Iacopini y col., 2008).

Según el tipo de unión que sucede entre las unidades monoméricas, pueden distinguirse dos clases de proantocianidinas. Las de tipo A presentan un enlace adicional C₂-O-C₇ o C₂-O-C₅, además del enlace común C₄-C₈ o por C₄-C₆, mientras que las tipo B tan sólo presentan el enlace C₄-C₈ o por C₄-C₆. Durante su degradación térmica en medio ácido, las proantocianidinas generan cianidinas y delfinidinas, mayormente. De este modo, las proantocianidinas pueden caracterizarse como procianidinas, compuestas por unidades de catequina y epicatequina, y prodelfinidinas, compuestas por unidades de galocatequina y epigalocatequina (Sun y Spranger, 2005).

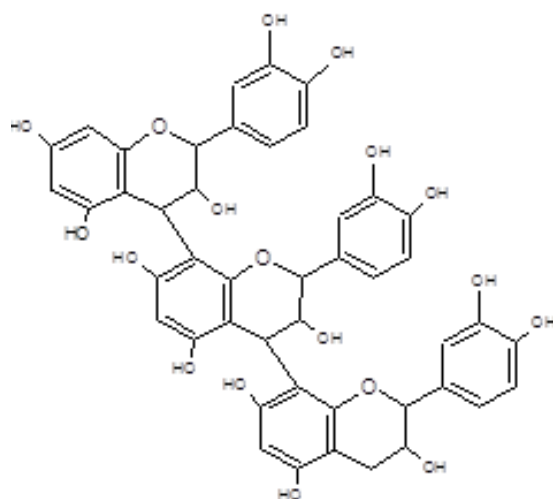


Figura 7. Representación de una proantocianidina trimérica en C₄.

Los flavonoles comparten la estructura general de 3-hidroxiavona, diferenciándose entre sí según los sustituyentes del anillo bencénico (B). A este grupo pertenecen

compuestos como la quercetina, el kaempferol y la miricetina. Comúnmente, se presentan en forma glucosilada unidos a glucosa y/o ramnosa, destacando entre ellos la rutina (derivado glucoramnósido de la quercetina).

Los antocianos son pigmentos presentes en flores y frutos, cuya función es proporcionar colores vivos como rojos, rosas, azules o púrpuras. Su estructura deriva del 2-benzopirilio o ión flavilio (o flavilium) y es el único grupo de flavonoides constituidos por un radical de carácter catiónico. Se presentan principalmente en forma glucosilada y acilada, puesto que esta unión le confiere estabilidad frente a cambios de pH, luz y condiciones de oxidación, previniendo así su degradación (Manach y col., 2004). Los antocianos se diferencian entre sí por las sustituciones hidroxilo y/o metoxilo del anillo bencénico (B) y por la naturaleza y número de ácidos que esterifican los azúcares a los que se encuentran unidos (principalmente ácido *p*-cumárico y ácido *p*-cafeico), existiendo por tanto, una gran diversidad de estructuras. Entre las antocianinas (agliconas de los antocianos) podemos distinguir diversas estructuras como: malvidina, cianidina, delphinidina, pelargonidina, petunidina y peonidina.

1.2.2. Actividades biológicas asociadas a los compuestos fenólicos.

El consumo de compuestos fenólicos en la dieta se ha asociado con efectos beneficiosos para la salud. Así se han descrito distintas actividades biológicas para este grupo de compuestos, tales como una actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y anticancerígena. Debido a estas propiedades, actualmente se está apoyando el empleo de los compuestos fenólicos en la industria farmacéutica, alimentaria o cosmética (Teixeira y col., 2014).

1.2.2.1. Actividad antioxidante

Desde un punto de vista biológico, el estrés oxidativo se puede definir como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el H_2O_2 o el $O_2^{\bullet-}$, y la capacidad del cuerpo humano para eliminarlos. Estos ROS tienen un papel importante en diversos procesos fisiológicos, actuando como señalizadores celulares y reguladores de las citoquinas, factores del crecimiento, de la acción hormonal, la transcripción, como neuromoduladores, inmunomoduladores y durante la apoptosis. Sin embargo, una sobreproducción de ROS puede provocar daños oxidativos en el DNA, en los lípidos o en las proteínas, teniendo por tanto un papel esencial en el desarrollo del

envejecimiento celular, así como en el desarrollo de enfermedades con base oxidativa como el cáncer, la aterosclerosis, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas (Gupta y col., 2014).

Actualmente, se han propuesto diversos fitoquímicos naturales presentes en los alimentos como compuestos dotados una alta actividad antioxidante, destacando especialmente los compuestos fenólicos (Halliwell y col., 1995; Du y col., 2009). Así, compuestos como los flavan-3-oles, los flavonoles (aglicona y glucosilados), el estilbeno *trans*-resveratrol, los antocianos y ácidos fenólicos como el gálico han demostrado una importante capacidad antioxidante (Manach y col., 2004, Tabart y col., 2009).

En este sentido, diversos estudios han puesto de manifiesto que los alimentos ricos en compuestos fenólicos son capaces de reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades debido a la capacidad antioxidante de estos compuestos. Así, las catequinas del té han mostrado tener capacidad antiaterogénica al evitar la oxidación de las LDL del plasma, etapa esencial para el desarrollo de esta patología (Gharras, 2009). Asimismo, estos compuestos parece que poseen un efecto neuroprotector en modelos animales, ya que reducen la cantidad de ROS y RNS (especies reactivas de nitrógeno) localmente, evitando así la autoxidación del neurotransmisor NO (òxido nítrico) que es una etapa esencial para el desarrollo de las placas β -amiloideas y la degeneración de la dopamina, responsables de la enfermedad de Alzheimer y el Parkinson, respectivamente (Mandel y Youdim, 2004; Esposito y col., 2002; Aquilano y col., 2008).

Del mismo modo, las uvas y sus productos derivados han mostrado, igualmente, tener capacidad antioxidante frente a la oxidación de las LDL (Teixeira y col., 2014). En este sentido, un estudio “*in vivo*” con pacientes humanos muestra cómo el consumo de un producto derivado de las semillas de uva es capaz de evitar la oxidación de las LDLs al detectarse niveles menores de malondialdehído tras el consumo de estos productos (Sano y col., 2007).

Asimismo, compuestos fenólicos frecuentes en las uvas como la malvidina y más intensamente el resveratrol, participan en la regulación de vías celulares que contribuyen al mantenimiento fisiológico normal al reducir la cantidad de ROS (Bognar y col., 2013). En este mismo sentido, se ha observado que la quercetina es capaz de prevenir los desórdenes gástricos al proteger a la mucosa gástrica frente a daño

oxidativo (Hu y col., 2015). Además, por su capacidad de actuar como reductores de la cantidad de ROS, los compuestos fenólicos presentes en el vino (y algunos en el té) como la epicatequina, el galato de epicatequina, la epigallocatequina, el galato de epigallocatequina, el ácido protocatéquico, el ácido vainílico, la quercetina y la miricetina han mostrado una capacidad protectora del DNA al impedir el daño oxidativo mediado por cobre (Perrón y col., 2011).

Los compuestos fenólicos provenientes del cacao también han suscitado un gran interés por los beneficios saludables asociados a dichos compuestos. En este sentido, la epicatequina presente en el cacao se ha descrito como un compuesto con capacidad de reducir el riesgo a padecer diabetes tipo II al disminuir el daño oxidativo inducido por una dieta rica en glucosa (Cordero-Herrera y col., 2015). Asimismo, la epicatequina y en menor medida la catequina, son capaces de atravesar la barrera cerebral exhibiendo propiedades neuroprotectoras al reducir localmente la cantidad de ROS. Del mismo modo, por su capacidad antioxidante dichos compuestos son capaces de impedir daños oxidativos del DNA (Nehlig, 2012).

En este sentido, también destacan los cítricos por su contenido en flavanonas como la hesperidina y la naringenina, así como en neohesperidina, hesperitina y eriodictiol con reconocido efecto antioxidante. La hesperidina y la hesperitina han demostrado atenuar la cantidad de ROS gracias a su capacidad antioxidante tanto en ensayos “*in vivo*” como “*in vitro*”, mostrando con ello un efecto protector del DNA (Parhiz y col., 2015). Asimismo, Di Majo y col., (2005) indican que la naringenina, entre otras flavanonas, es capaz de evitar la oxidación de las LDL.

Además, estudios realizados tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” indican que los compuestos fenólicos de los frutos rojos, como los antocianos y el ácido cafeico poseen un efecto beneficioso para la salud debido a su poder antioxidante. En este sentido, el consumo de fresas, arándanos, zarzamoras y moras exhiben un efecto neuroprotector al ser capaces de reducir localmente la cantidad de ROS (Basu y col., 2010; Rendeiro y col., 2012). Del mismo modo, los antocianos presentes en dichos frutos rojos han mostrado actividades antiaterogénicas al reducir la oxidación de las LDL en sangre (Mahmoud, 2013).

La granada destaca por su contenido en elagitaninos, formados por la polimerización del ácido gálico. Estos compuestos han mostrado una gran capacidad antioxidante,

reduciendo el nivel de ROS. Así, estos compuestos han mostrado poseer una importante acción anticancerígena y antiinflamatoria mediada por su capacidad antioxidante. No obstante, la baja absorción intestinal que presentan estos compuestos indica que este importante efecto tan sólo puede designarse, por el momento, a un nivel gastrointestinal (protección del epitelio intestinal) (García-Muñoz y Vaillant, 2014).

Los compuestos fenólicos presentes en las aceitunas y en los aceites son actualmente uno de los compuestos fenólicos de mayor interés. Entre todos ellos, destacan la oleuropeína y el hidroxitirosol, así como sus derivados, ya que presentan una importante actividad antioxidante gracias a la elevada biodisponibilidad que presentan. Así, estos compuestos son capaces de ejercer una importante actividad antioxidante frente a los ROS, de la que derivan su contrastada actividad antiinflamatoria y antiaterogénica (Bulotta y col., 2014). En este sentido, el hidroxitirosol y sus derivados presentes en el aceite de oliva son los únicos compuestos fenólicos que han recibido la aceptación, por parte de la Unión Europea, para declarar su función antioxidante. De esta manera, la declaración “contribuye a la protección de los lípidos sanguíneos frente al estrés oxidativo” es aplicable tan solo para aceites de oliva que contengan 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados (oleuropeína y tirosol) por cada 20 g de aceite, que es el consumo diario recomendado para conseguir dicho efecto beneficioso.

1.2.2.2. Actividad antiinflamatoria.

La inflamación se define como un conjunto amplio de procesos fisiológicos y patológicos desencadenados bien por una infección o bien por la lesión a un tejido (trauma, isquemia o autoinmune). La respuesta inflamatoria involucra un conjunto complejo de interacciones entre diversos factores de señalización y las células, lo que permite normalmente, recuperar el estado fisiológico normal. Por el contrario, si la respuesta inflamatoria se prolonga debido a situaciones patológicas se desencadena una respuesta inflamatoria de tipo crónico. Entre las principales patologías que se desencadenan por un proceso inflamatorio crónico están: la aterosclerosis, el cáncer, la artritis reumatoide o algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Nathan, 2002; Medzhitov, 2008).

En este sentido, numerosos autores han indicado la capacidad antiinflamatoria de ciertos compuestos fenólicos presentes en los alimentos. Así, la quercetina es capaz de inhibir la vía de señalización de la NF- κ B, reduciendo la síntesis de NO y con ello el riesgo al

desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Aquilano y col., 2008). Del mismo modo, se ha descrito que la malvidina puede atenuar la respuesta inmune generada por la activación del NF- κ B en macrófagos de ratón activados con LPS (Bognar y col., 2013).

Asimismo, Montagut y col., (2009) observaron que ciertos compuestos fenólicos frecuentes en el vino, tales como el ácido gálico, el ácido vainílico, la catequina, la epicatequina, el galato de epicatequina y el galato de epigallocatequina, así como los dímeros B₁, B₂, B₃ y B₄ y el trímero C₁, eran capaces de reducir la expresión de mediadores inflamatorios como el NO y la prostaglandina E₂ (PGE₂), siendo especialmente marcadas para el ácido vainílico, la catequina y los dímeros de flavanoles. Por el contrario, los ácidos p-cumárico, ferúlico, protocatéquico y 3-hidroxibenzoico no mostraron tener actividad inhibidora frente a la liberación de estos mediadores proinflamatorios. Además, diversos estudios *in vivo* evidencian que los compuestos fenólicos presentes en el vino o los productos derivados de las uvas poseen actividad antiinflamatoria al reducir la activación y expresión del NF- κ B, moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1 y VCAM-1) y de la interleuquina IL-1 β (Estruch y col., 2004; Martínez y col., 2013; Tomé-Carneiro y col., 2013). Asimismo, la quercetina es capaz de reducir la inflamación en intestino de murinos al inhibir la vía de señalización por TNF- α (a través de una vía distinta del NF- κ B).

Respecto a los flavonoides presentes en el cacao se ha visto que son capaces de regular la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria. De este modo, la catequina y el galato de epicatequina del cacao son capaces de regular la expresión génica de ciertos genes involucrados en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, tales como los genes de que codifican para ciertas interleuquinas, la COX-2, la producción de NO y de la enzima iNOS (Nehlig, 2012).

Del mismo modo las proantocianidinas oligoméricas presentes en los frutos secos, como los cacahuates, y en menor medida los flavanoles monoméricos del mismo, han mostrado ser capaces de reducir la secreción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6) y del NF- κ B, reduciendo así el riesgo de desarrollar melanomas (Tatsuno y col., 2012).

Asimismo, son numerosas las investigaciones que ponen de manifiesto la capacidad antiinflamatoria de los compuestos fenólicos del té. En este sentido, se ha descrito que dichos compuestos son capaces de reducir la secreción de ciertas interleuquinas como la

TNF- α (Noh, 2011) o la IL-6, así como la expresión de otros mediadores de la inflamación como COX-2 o PGE2, siendo de este modo capaces de reducir el riesgo de padecer cáncer o enfermedades cardiovasculares (Chen y col., 2011). El galato de epicatequina, uno de los principales flavanoles del té, ha mostrado capacidad antiinflamatoria al reducir la expresión génica de la STAT-1 (Tedeschi y col., 2002).

Además, los elagitaninos presentes en la granada han suscitado gran interés al ser capaces de reducir la respuesta inflamatoria. De esta manera, los extractos de la cáscara de granada ricos en elagitaninos (punicalagina), han mostrado tener la capacidad de reducir la respuesta inflamatoria intestinal (Hollebeeck y col., 2012).

1.2.2.3. Otras actividades.

También se ha descrito que los compuestos fenólicos poseen una importante actividad anticancerígena frente a diversos tipos de cánceres. Dicha actividad no estaría basada en su actividad antioxidante, sino en su capacidad de regular diversos mecanismos celulares como la expresión de ciertos genes, de inducir la apoptosis de las células cancerígenas, etc. Así, son diversos los compuestos fenólicos que muestran estos efectos, como las proantocianidinas, el resveratrol, el galato de epicatequina, el ácido gálico y los antocianos (Johnson y col., 1994).

En este sentido, existen estudios que sugieren la existencia de una relación entre el consumo de los compuestos fenólicos del té y la reducción del riesgo de padecer algunos tipos de cáncer como el de próstata (Davalli y col., 2012). Asimismo, los compuestos fenólicos más abundantes del té verde: la catequina, el galato de epicatequina y la epigallocatequina y el galato de epicatequina, son capaces de inducir la apoptosis en células cancerosas provenientes de cáncer de mama (Landis-Piwowar y col., 2007). También, estas catequinas se han asociado con acciones anticancerígenas frente a diversos cánceres de boca al inhibir la producción de metaloproteasas, lo que reduce la invasión y migración celular, induce la apoptosis y detiene la proliferación en este tipo de células cancerosas; así como un descenso en la incidencia de cáncer intestinales y de estómago, bien por su efecto protector frente a mutagénicos o porque inhiben las señales bioquímicas necesarias para la iniciación o progresión del cáncer (Gramza y col., 2005).

Las proantocianidinas, altamente concentradas en vinos tintos, frutas y chocolate, son capaces de reducir la proliferación de células cancerosas infectadas por el virus del papiloma (Petti y Scully, 2009). Además, las proantocianidinas presentes en las semillas de uva han mostrado tener capacidad “*in vitro*” de inducir la apoptosis e inhibir la proliferación celular de células cancerosas de mama, así como una inhibición de la metástasis de células cancerosas de pulmón (Mantena y col., 2006). Los flavonoides metoxilados presentes en cítricos y pimienta también son capaces de inhibir la formación de aductos en el DNA promovidos por ciertos carcinogénicos, como las nitrosaminas del tabaco (Petti y Scully, 2009).

Otra de las actividades que se ha asociado a los compuestos fenólicos es la capacidad antimicrobiana, describiéndose en numerosos casos como compuestos naturales con actividad antimicrobiana frente a hongos, bacterias y virus (Li y col., 2014).

En este sentido, los taninos hidrolizables, los antocianos y otros compuestos fenólicos presentes en la granada presentan actividad antimicrobiana frente a determinadas bacterias, virus, hongos y protozoos (Tanveer y col., 2015). Asimismo, los compuestos fenólicos presentes en las cerezas son capaces de reducir el crecimiento de *Salmonella* y de *Listeria monocytogenes* (Kolodziejczyk y col., 2013).

Además, los compuestos fenólicos de las pepitas de uva han mostrado actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, y Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas auriginosa*. Además, el ácido cafeico, la quercetina o la rutina presentes en las uvas han demostrado una actividad bacteriostática frente a *Listeria monocytogenes* (Teixeira y col., 2014).

En este mismo sentido, *Staphylococcus aureus* muestra una especial sensibilidad a los compuestos fenólicos presentes en la miel, mientras que otros como *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* son moderadamente sensibles a estos compuestos (Álvarez-Suárez y col., 2010).

Además, los compuestos fenólicos presentes en el té, cacao y café han mostrado tener una actividad anticariogénica debida a sus propiedades antimicrobianas, ya que son capaces de modular la microbiota bucal (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*) reduciendo tanto la formación del biofilm como de los ácidos derivados de la misma (Ferrazzano y col., 2009).

Los compuestos fenólicos también se están estudiando como potenciales compuestos antimicrobianos capaces de conservar los alimentos. En este sentido, el principal compuesto fenólico del té, el galato de epicatequina, ha mostrado ser capaz de reducir el número de esporas de *Clostridium thermoaceticum* y *Bacillus stearothermophilus* durante tratamientos térmicos (Sakanaka y col., 2000).

De este modo, son numerosos los estudios que indican que los compuestos fenólicos poseen diversas actividades más allá de su capacidad antioxidante, englobando tanto las comentadas anteriormente como otras, entre las que se encuentra su capacidad cardioprotectora. Sin embargo, de todas estas actividades mencionas tan sólo los flavanoles del cacao han sido autorizados por la Unión Europea para poder emitir una declaración saludable, al considerar que por el momento, son los únicos con suficiente evidencia científica. En este sentido, la declaración “los flavanoles del caco mantienen la elasticidad de los vasos sanguíneos, lo cual contribuye a mantener un flujo sanguíneo normal” atribuida a estos compuestos, tan sólo podrá ser declarada cuando se consuma en forma de cápsulas o tabletas que contengan extracto de cacao con un alto contenido en flavanoles de un grado de polimerización de 1 a 10 y que suponga un consumo diario de 200 mg de los mismos.

1.2.3. Fuentes naturales de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son fitoquímicos naturales presentes en las plantas, a partir de las cuales se pueden obtener extractos ricos en estos compuestos. Los flavonoides, junto con otros fenoles como los ácidos fenólicos, los estilbenos, los taninos y los lignanos, son especialmente comunes en hojas, frutos, tejidos con flores y las partes leñosas (como los raspones y las cortezas).

Los ácidos hidroxibenzoicos se encuentran en frutas, cereales y granos. Además, estos compuestos pueden presentarse como lignanos en las plantas, se encuentran principalmente en la semilla oleaginosa del lino, y en menor cantidad en algas, leguminosas, cereales, vegetales (ajos, espárragos y zanahorias) y en frutas (peras y ciruelas) (Gharras, 2009). Además, pueden encontrarse dímeros del ácido gálico (ácido elágico) en alimentos como las uvas (Prodanov y col., 2013), así como elagitaninos en las granadas (Zhou y col., 2011).

Los ácidos hidroxicinámicos son los ácidos fenólicos más comunes en plantas, principalmente en forma de ácido cafeico esterificado con ácido siquímico, quínico (clorogénico) y tartárico (caftárico). Los mayores contenidos de estos compuestos se encuentran en frutas (arándanos, kiwis, pomelo, ciruelas cerezas y manzanas), encontrándose en todas las partes del fruto, aunque los mayores contenidos se presentan en las partes externas de las frutas maduras, en el café, principalmente como ácido clorogénico en este último, así como en otras frutas, tomates y cereales.

Los estilbenos son compuestos minoritarios en la dieta humana y no se encuentran con frecuencia en las plantas. Sin embargo, el resveratrol, una fitoalexina perteneciente a este grupo de compuestos, puede encontrarse principalmente en los vinos, existiendo cantidades bajas tanto en su forma aglicona (de 0,3 mg a 7 mg/L de vino) como en su forma glucosilada (15 mg/ L de vino) (Manach y col., 2004). Aunque su fuente principal son las uvas y el vino, también puede encontrarse en otros alimentos como los cacahuetes o los arándanos (Lyons y col., 2003; Chukwumah y col., 2011).

Los flavonoides se encuentran en los alimentos principalmente en forma de quercetina y kaempferol y frecuentemente asociados a una unidad glucídica (generalmente glucosa o galactosa). En cuanto a su contenido, este se ha determinado generalmente en concentraciones relativamente bajas, de 15 mg a 30 mg de compuesto/ Kg de peso fresco, encontrándose los mayores contenidos en cebollas, coles, puerros, brócoli y arándanos. Además, también se han detectado cantidades importantes en vinos tintos y té (superiores a 45 mg/ L de producto) (Manach y col., 2004).

Las flavanonas se pueden encontrar en los tomates y algunas plantas aromáticas como la menta, pero sin duda, los mayores contenidos se encuentran en los cítricos. Estos compuestos son especialmente abundantes en la zona del albedo y las membranas que separan los segmentos del fruto, por lo que el fruto entero puede contener hasta 5 veces más flavanonas que el zumo del mismo. En cuanto a las formas aglicona, las principales son la naringenina, hesperetina y eriodictiol, hallados en pomelos, naranjas y limones, respectivamente. No obstante, dichos compuestos se encuentran unidos frecuentemente a un disacárido en la posición 7, en donde se pueden destacar los derivados de la naringenina, la narirutina (naringenina-7-O-rutinósido) y la naringina (naringenina-7-O-neohesperidósido) y el derivado de la hesperetina, la hesperidina (hesperetina-7-O-rutinósido) (Gharra, 2009).

Las flavonas son menos comunes en frutas y vegetales, encontrándose principalmente en formas glicosiladas de luteolina y apigenina. Estos compuestos se han detectado en cantidades amplias en las pieles de los cítricos, mientras que fuentes comestibles como el perejil y el apio o plantas aromáticas como la mejorana contienen cantidades importantes de estos compuestos.

Las isoflavonas se encuentran únicamente en las leguminosas, siendo la soja y sus productos derivados las fuentes principales de estos compuestos en la dieta humana. Su contenido en las habas de soja depende de diversos factores agroclimáticos y del procesado, detectándose contenidos de entre 580 mg a 3.800 mg de isoflavonas/ Kg de soja fresca, y contenidos de 30 mg a 175 mg/ L de bebida de soja (Moon y col., 2000).

Como ya se ha comentado con anterioridad, los flavanoles pueden encontrarse como monómeros de estos (catequinas) o en formas polimerizadas (proantocianidinas). Estos compuestos son frecuentes en frutas, té, chocolate, vinos y leguminosas. En cuanto a las frutas, la catequina y la epicatequina son los compuestos mayoritarios, aunque en uvas y vinos pueden encontrarse también galato de catequina, epigallocatequina y galato de epicatequina, al igual que en el té.

Los flavanoles son abundantes también en los vinos (más de 300 mg/L), aunque las fuentes más ricas son el té y el chocolate. En este sentido, una infusión de té verde puede contener más de 200 mg de catequinas. Sin embargo, hay que considerar que el té negro posee un contenido inferior de estos compuestos, ya que durante el denominado proceso de fermentación de las hojas del té, se producen reacciones de oxidación mediadas por la enzima catecol oxidasa, la cual provoca reacciones de dimerización de estos compuestos. Estas reacciones de oxidación dan origen por tanto, a la formación de dímeros (teaflavinas) y de una mezcla compleja de compuestos oligómeros y polímeros (tearubiginas), reduciendo por tanto el contenido inicial de catequinas. Además, resulta importante indicar que el contenido de catequinas es notablemente mayor en las semillas, como sucede en las uvas, que para el resto del fruto (Dani y col., 2007).

Las proantocianidinas son frecuentes en los frutos, responsables del sabor astringente que estos proporcionan. De este modo, son los principales compuestos fenólicos de las uvas (especialmente en pepitas y hollejos), encontrándose además en frutas como el caqui, el melocotón, manzanas, peras, bayas, etc., así como en derivados de estos como

el vino y la sidra, u otros productos como la cerveza, el té, el chocolate (Gharra, 2009) o las semillas del cacao (Ioannone y col., 2015).

Los antocianos se encuentran en las vacuolas de los tejidos epidérmicos de las flores y los frutos. En la dieta, podemos encontrar antocianos en el vino tinto, frutos rojos y uvas, ciertas variedades de cereales, así como en ciertos vegetales foliares y hortalizas (berenjenas, coles, alubias, cebollas y rábanos). El contenido de estos compuestos es proporcional al color que presentan, incrementándose además con el progreso de la maduración del fruto. Su contenido es especialmente elevado en los frutos rojos y en el vino tinto, pudiendo llegar a aportar 900 mg de antocianos/L de vino (Echeverry y col., 2005) o de 2 g a 4 g/ Kg de fruto fresco (Manach y col., 2004).

1.3. La uva como fuente de compuestos fenólicos.

Las uvas (*Vitis vinifera* L.) son frutos ricos en compuestos fenólicos, donde estos compuestos se encuentran mayoritariamente en las pepitas y en cantidades notablemente inferiores en los hollejos, siendo minoritario por tanto, en la pulpa. Las uvas tintas contienen, generalmente, mayores concentraciones de compuestos fenólicos que las uvas blancas, existiendo además, una fuerte variación intervarietal (Dani y col., 2007; Yang y col., 2009).

En las uvas, los compuestos no flavonoideos se presentan principalmente en forma de ácidos fenólicos. Los ácidos hidroxibenzoicos más comunes en las uvas y vinos son el ácido gálico, el protocatéquico, el vainílico y el sirínico. Además, en las uvas también pueden encontrarse formas poliméricas del ácido gálico (taninos hidrolizables), como el dímero de este ácido, el ácido eláico. En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos, los más comunes en las uvas son el ácido cumárico, el cafeico y el ferúlico (Hogan y col., 2009).

Uno de los compuestos minoritarios que podemos encontrar en las uvas es el resveratrol, tanto en su forma isomérica *cis* como *trans*. Es el estilbeno más común y en las uvas se genera como respuesta a ataques infecciosos y radiaciones UV, por lo que su contenido es muy variable en función de la variedad y de las condiciones ambientales (Iacopini y col., 2008).

Los flavonoides más abundantes en las uvas son los flavonoles, flavanoles y antocianos. Los flavanoles más representativos son el grupo de las catequinas, donde pueden encontrarse catequina, galocatequina, epicatequina y epigalocatequina, tanto en forma

monomérica, principalmente de catequina, como en forma de proantocianidinas y taninos condensados. Los flavonoles más comúnmente encontrados son los derivados de la quercetina, la miricetina y el kaempferol, los cuales se presentan unidos a una molécula de ácido glucurónico o a diversos tipos de glicósidos. Por su parte, los antocianos son los principales responsables del color de los hollejos de las uvas tintas. En las uvas se encuentran en forma de antocianinas monoglucosiladas, principalmente de malvidina (Hogan y col., 2009; McDougall y col., 2005).

Con respecto a la composición fenólica de las diferentes partes que constituyen el racimo de uva (raspón, pepitas, hollejos y pulpa), pueden apreciarse diferencias entre ellos. La escasa información existente respecto al raspón indica la presencia de ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoles y estilbenos, aunque también se pueden encontrar pequeñas cantidades de otros compuestos como aldehídos fenólicos (Teixeira y col., 2014).

En este sentido, entre los ácidos fenólicos que se pueden encontrar en el raspón destaca el ácido gálico como el principal ácido hidroxibenzoico, existiendo además cantidades menores de los ácidos protocatéquico, p-hidroxibenzoico, vainílico y sirínico. Con respecto a los ácidos hidroxicinámicos, el principal compuesto es el ácido caftárico, aunque también se pueden encontrar cantidades menores de otros ácidos como el ácido cafeico, el ácido p-cumárico y el ácido ferúlico (Anastasiadi y col., 2009).

Los compuestos mayoritarios del raspón son sin duda, los flavanoles, principalmente en forma de polímeros de proantocianidinas, aunque también puede encontrarse una cantidad importante de monómeros de catequinas y en menor medida, dímeros de los mismos. En este sentido, el compuesto mayoritario corresponde a la catequina, encontrándose la epicatequina en menor medida, seguido del galato de epicatequina. Los dímeros B₁ y B₃ no aparecen siempre en la literatura, mientras que el dímero B₂ aparece con mayor frecuencia (Souquet y col., 2000; Delgado-Torre y col., 2012, Anastasiadi y col., 2012; González-Centeno y col., 2012).

En cuanto a la composición de flavonoles del raspón, este se caracteriza por contener principalmente quercetina y sus derivados, encontrándose los derivados glucosilados (quercetina-3-O-glucósido) y glucuronidados (quercetina-3-O-glucurónico) como los principales flavonoles. Además, algunos autores indican la presencia de otros derivados como la rutina o de otros flavonoles como el kaempferol.

Además, el raspón constituye una fuente importante de diversos estilbenos, principalmente en forma de trans-resveratrol y sus derivados, como la ϵ -viniferina (Souquet y col., 2000; Anastasiadi y col., 2012; Delgado-Torré y col., 2012).

La composición fenólica de las pepitas consiste básicamente en flavanoles (flavan-3-oles), los cuales se encuentran en su mayor parte en forma de proantocianidinas, y en menor medida, como oligómeros y monómeros de los mismos (Sun y col., 2001; Spranger y col., 2008). Las proantocianidinas de las pepitas están compuestas únicamente por unidades de catequina, epicatequina y galato de epicatequina, y por tanto, tan solo contienen procianidinas. Con respecto a los flavanoles monoméricos, se han identificado la catequina, epicatequina y galocatequina, así como algunos derivados galoilados como el galato de epicatequina, aunque en ocasiones también se ha indicado la presencia de galato de epigalocatequina. Los dímeros determinados con mayor frecuencia son el B₁, B₂, B₃ y B₄, y en ocasiones se ha indicado la presencia de otros dímeros como el B₅ y el B₆, siendo el B₂ el mayoritario en las pepitas (Anastasiadi y col., 2009; Chamorro y col., 2012; Ćurko y col., 2014; Prodanov y col., 2013).

En las pepitas también puede encontrarse un pequeño contenido en flavonoles, principalmente de quercetina y sus derivados, como es el caso de la rutina, la quercetina-3-O-glucósido y la quercetina-3-O-galactósido (hiperósido). Además, entre los ácidos fenólicos, el ácido gálico es el que se encuentra con más frecuencia (Hogan y col., 2009), aunque las pepitas también contienen otros ácidos hidroxibenzoicos como los ácidos protocatequico y sirínico, así como pequeñas cantidades de ácidos hidroxicinámicos como el ácido p-cumárico, el ácido ferúlico o el ácido caftarico. Junto con estos, pueden encontrarse formas oligoméricas del ácido gálico, como es el ácido elágico y derivados del mismo (Anastasiadi y col., 2009; Prodanov y col., 2013).

En cuanto a la composición fenólica de los hollejos, los flavanoles son los principales compuestos de los hollejos de las uvas blancas, encontrándose en cantidades importantes también en las variedades tintas (Katalinić y col., 2010), aunque en menor proporción que los antocianos (Ćurko y col., 2014). Estos compuestos son los principales responsables del color de los hollejos de las uvas tintas, encontrándose principalmente malvidina-3-O-glucósido (Hogan y col., 2009; McDougall y col., 2005), además de sus derivados y otros antocianos como cianidina, delphinidina, petunidina y peonidina (Revilla y col., 1999; Obreque-Slier y col., 2013).

La composición de proantocianidinas de los hollejos difiere considerablemente de la de las pepitas, ya que en los hollejos encontramos proantocianidinas de mayor grado de polimerización y un menor porcentaje de unidades galoiladas, constituidas tanto por procianidinas como por prodelfinidinas. En cuanto a los oligómeros, pueden encontrarse compuestos con diferentes grados de polimerización, como dímeros y trímeros, destacando el dímero B₁ por ser el dímero predominante. Con respecto a los monómeros, la catequina se encuentra en cantidades superiores a la epicatequina (Sun y Spranger, 2005), pudiendo encontrarse otros flavanoles como la epigallocatequina y galato de epicatequina.

Además de los flavanoles y antocianos, pueden encontrarse otros flavonoides como los flavonoles, representados principalmente por la quercetina, el kampferol y los derivados de estos, tales como la quercetina-3-O-glucurónido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-rutinósido, quercetina-3-O-galactósido, kampferol-3-O-glucurónido y kaempferol-3-O-glucósido (Montealegre y col., 2006; Teixeira y col., 2014).

Entre los compuestos no flavonoideos, el ácido gálico es el ácido fenólico mayoritario (Hogan y col., 2009). Junto con este, pueden encontrarse otros ácidos hidroxibenzoicos como derivados del ácido gálico y el ácido protocatéquico, además de ácidos hidroxicinámicos como el ácido caftárico, fertárico y el p-cumárico. También, en los hollejos se localizan cantidades importantes de estilbenos, principalmente como trans-resveratrol y su derivado glucosilado, el trans-piceido (Montealegre y col., 2006; Corrales y col., 2010; Di Lecce y col., 2014).

Por último, la pulpa se caracteriza principalmente por poseer ácidos fenólicos y flavanoles, aunque en mucha menor cantidad que en el resto (raspones, pepitas y hollejos) (Du y col., 2009; Dani y col., 2007; Iacopini y col., 2008).

1.4. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos presentes en la uva.

Es importante destacar que la actividad real de los compuestos fenólicos de la dieta depende, no solo, de sus posibles efectos saludables, sino también de su absorción y metabolismo (Balasundram y col., 2006), lo que define la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, incluyendo tanto su paso por el tracto gastrointestinal como el proceso de absorción intestinal.

Durante la digestión, se ha observado que los compuestos fenólicos pueden experimentar diversos procesos, alterando así su composición, entre los que se incluyen interacciones con las proteínas digestivas (pepsina y pancreatina) o precipitaciones (Serra y col., 2010; Siracusa y col., 2011; Helal y col., 2014), descomposición por el pH ácido o básico del medio (Spencer y col., 2001; Noguer y col., 2008), dimerizaciones (Yoshino y col., 1999; Neilson y col., 2007), autoasociaciones (Krook y col., 2012) o conversiones entre ellos (Zhu y col., 2002).

De este modo, algunos estudios ponen de manifiesto el efecto de la digestión sobre los compuestos fenólicos presentes en las uvas, vinos o extractos de subproductos de la vinificación, observándose cambios en su composición durante este proceso e indicando que la etapa estomacal y/o intestinal son etapas críticas para la composición y actividad antioxidante del extracto (Fernández y Labra, 2007, Noguer y col., 2008; Tagliazucchi y col., 2010; Stalmach y col., 2012).

En este sentido, se han detectado interacciones entre flavanoles y proantocianidinas con las proteínas salivares (Obreque-Slier y col., 2011; Sun y col., 2013), mientras que Laurent y col., (2007) observaron que durante la digestión de un extracto de pepitas se produce una pérdida importante de flavanoles (catequina, epicatequina, dímero B₂ y dímero B₃) como consecuencia, principalmente, de su interacción con las enzimas intestinales. En este proceso, se ha descrito que la catequina resulta, en general, más estable que la epicatequina (Zhu y col., 2002).

Los ácidos fenólicos del vino, así como los estilbenos, parecen ser en general, compuestos fenólicos resistentes tanto al pH ácido del estómago como al pH intestinal, a excepción del ácido gálico quien reduce su contenido a causa del pH intestinal. No obstante, la degradación de estructuras más complejas podría resultar en la liberación de este compuesto y como consecuencia, en un incremento final de su contenido (Martínez-Ortega y col., 2001).

Los antocianos presentes en los vinos y en los hollejos de las uvas tintas son resistentes al pH estomacal, produciéndose tan solo pequeñas reducciones en su contenido. Sin embargo, durante la etapa intestinal, como consecuencia del pH del medio se producen degradaciones de estos compuestos, a partir de las cuales se pueden generar ciertos ácidos fenólicos (como el p-cumárico, protocatéquico o el cafeico), así como el aldehído protocatéquico (Noguer y col., 2008).

Finalmente, la digestión de diversos vinos y compuestos puros indica un descenso en el contenido de flavonoles (quercetina y derivados) tras el proceso de la digestión (Martínez-Ortega y col., 2001).

De este modo, la digestión de los compuestos fenólicos es un proceso complejo, donde pueden observarse datos controvertidos entre los diferentes estudios realizados. En este sentido, Laurent y col., (2007) observaron que en la digestión de un extracto de pepitas únicamente se producen cambios importantes de la composición fenólica durante la etapa intestinal, mientras que Stalmach y col., (2012) observaron cambios importantes en todos los grupos fenólicos durante la digestión estomacal de un mosto de uva tinta, los cuales se intensificaban posteriormente en la etapa intestinal. Asimismo, Martínez-Ortega y col., (2001) observaron diferencias entre las digestiones de diferentes vinos, así como de patrones puros.

El proceso de absorción intestinal de los compuestos fenólicos es, igualmente, un proceso complejo que involucra a diversos mecanismos, lo que hace que la absorción sea particular para cada tipo de compuestos. De este modo, son varios los estudios que demuestran la absorción de compuestos fenólicos típicos de las uvas y de sus productos derivados. En este sentido, se ha demostrado que los compuestos fenólicos de elevado peso molecular, como las proantocianidinas, no son capaces de atravesar la barrera intestinal, mientras que los compuestos monoméricos y de bajo peso molecular sí son absorbibles.

Así, se ha descrito que son biodisponibles diversos compuestos fenólicos monoméricos como la catequina, la epicatequina (Deprez y col., 2001), el galato de epicatequina (Vaidyanathan y Walle, 2003), la quercetina (Chabane y col., 2009) y sus derivados glucosilados (Murota y col., 2000), el resveratrol (Kaldas y col., 2003), el piceido (Henry-Vitrac y col., 2006), antocianos glucosilados (Bub y col., 2001) y diversos ácidos fenólicos como el ácido vainílico, el gálico, el ferúlico, el protocatéquico y el cafeico (Konishi y col., 2003).

Diversos estudios ponen de manifiesto cómo los compuestos fenólicos presentes en las uvas y en los vinos son capaces de ser absorbidos. Así, existen estudios *in vivo* en humanos que muestran la absorción de los compuestos fenólicos en estas matrices. En este sentido, Bub y col., (2001) observaron niveles sanguíneos de malvidina-3-O-glucósido tras la ingesta de vino tinto o mosto de uva tinta. Del mismo modo, Goldberg

y col., (2003) observaron la presencia en sangre de catequina, resveratrol y quercetina tras el consumo de vino, así como la presencia de catequina en plasma tras el consumo de vino reconstituido (Bell y col., 2000). Asimismo, Serra y col. (2010) observaron en ratas una amplia absorción de catequina (42 – 43 %) y epicatequina (55 – 57 %) provenientes de un digerido de pepitas, así como cantidades notablemente inferiores de galato de epicatequina, dímeros y trímeros.

1.5. Extracción de compuestos fenólicos mediante tecnologías limpias.

Para llevar a cabo la extracción de compuestos fenólicos, una de las técnicas más comúnmente empleadas son las extracciones convencionales sólido/líquido (SLE). Para este tipo de extracciones, se han descrito diversos factores que condicionan la eficacia de esta técnica, tales como la proporción de solvente, el ratio de muestra:solvente, el tamaño de partícula, el tipo de compuesto fenólico objeto de estudio, la temperatura y el tiempo de extracción, entre otros. De este modo, las condiciones óptimas de extracción son particulares para cada matriz.

Además, la extracción mediante técnicas convencionales va asociada generalmente a una serie de desventajas, tales como tiempos de extracción prolongados, procedimientos laboriosos y la generación de residuos tóxicos (Choi y col., 2003). En este sentido, cabe destacar que el procedimiento más empleado es el Soxhlet, aunque en ocasiones las extracciones llevadas a cabo por esta técnica resultan lentas, insuficientes o suponen un elevado consumo de disolventes orgánicos. Por ello, en los últimos tiempos se han estudiado otras técnicas de extracción con el fin de optimizar los procesos de extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos (Wijngaard y col., 2012). Entre estas técnicas podemos encontrar las extracciones MAE, UAE, SFE y PLE (Carabias-Martínez y col., 2005; Teixeira y col., 2014).

La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) y asistida por microondas (MAE) consiste en la aplicación de energías externas con el fin de promover el proceso de extracción, acortando así los tiempos de tratamiento e incrementando el rendimiento en comparación a las técnicas convencionales. Actualmente, ambas técnicas se han estudiado a escala de laboratorio y están siendo implementadas a nivel industrial.

La comparación de ambos métodos con las técnicas de extracción convencionales pone de manifiesto que requieren tiempos de extracción menores en comparación con las

extracciones convencionales. Este hecho podría ser debido, en UAE, a que el efecto de cavitación generado por la aplicación de ultrasonidos (frecuencias entre los 18 KHz y los 40 KHz) provoca la disrupción celular, mejorando por tanto los procesos de transferencia de masa y facilitando el acceso del solvente al contenido celular.

Por su parte, la extracción MAE emplea la energía de microondas con el fin de calentar los solventes polares en contacto con la matriz sólida, reduciendo así el tiempo de extracción y el consumo de disolvente. La técnica MAE se lleva a cabo a elevadas temperaturas (de 110 °C a 150 °C), lo que supone una crítica al proceso por exponer a los compuestos a condiciones de degradación.

La extracción mediante SFE ha sido considerada como una técnica respetuosa con el medio ambiente, así como una alternativa para la extracción de compuestos fenólicos, al evitar el empleo de elevadas cantidades de disolventes tóxicos. De este modo, el uso de CO₂ en condiciones supercríticas (150 bares y de 30 °C a 40 °C) permite la obtención de extractos fenólicos evitando posibles procesos de degradación térmica o química, puesto que el CO₂ es un disolvente inerte, no tóxico y volátil. Además, el empleo de modificadores permite la obtención de extractos con propiedades mejoradas (mayor actividad antioxidante, menor color y exento de aromas), generando de este modo, productos con un mayor valor añadido (Teixeira y col., 2014). Así, la extracción de compuestos fenólicos con SFE se lleva a cabo en tiempos menores que la sólido líquido convencional y permite el fraccionamiento de la muestra durante la extracción. Sin embargo, la alta polaridad unida al peso molecular que los compuestos fenólicos poseen hace necesario, en la mayor parte de los casos, el uso de co-solventes de extracción, como el etanol. Asimismo, los rendimientos obtenidos con esta técnica son menores a los registrados respecto a otras (Herrero y col., 2006).

1.5.1. Extracción con fluidos presurizados.

La extracción mediante fluidos presurizados (PLE o PFE) es una técnica que combina la aplicación de elevadas presiones y temperaturas a los solventes de extracción (Carabias-Martínez y col., 2005). De este modo, la técnica de extracción PLE permite elevar la temperatura de los disolventes por encima de su punto de ebullición al tiempo que se mantienen en estado líquido (Pronyk y Mazza, 2009). En la Figura 8 se muestra un esquema de un equipo de extracción a altas presiones.

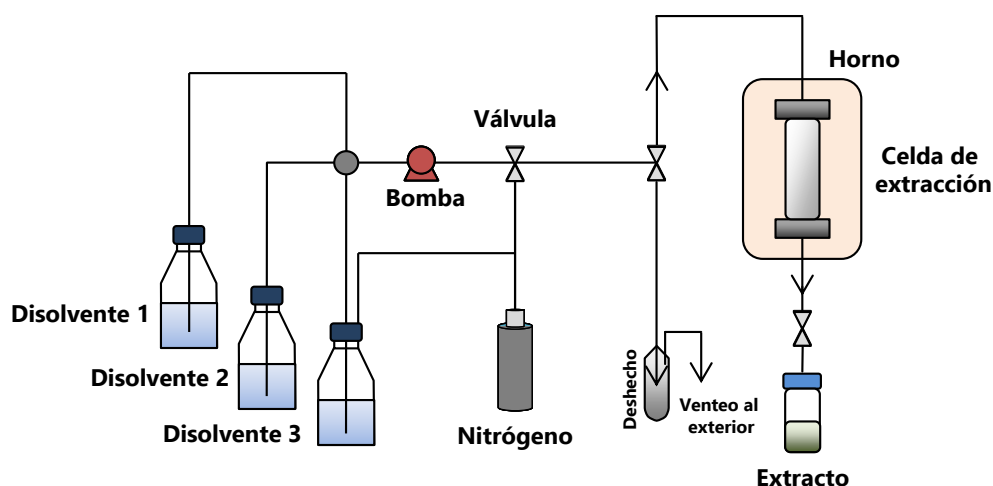


Figura 8. Diagrama de un equipo de extracción mediante PLE.

La aplicación de temperaturas elevadas incrementa el rendimiento de la extracción y la transferencia de masa, pues temperaturas mayores generalmente implican: un incremento en la capacidad de solubilidad de los disolventes, un incremento en el ratio de difusión de los analitos, una mayor disrupción de las uniones de los analitos a la matriz, un descenso en la viscosidad del solvente y un descenso en la tensión superficial. Además, la aplicación de elevadas presiones mantiene el solvente en estado líquido y lo conduce con mayor facilidad a través de los poros de la matriz, mejorando por tanto la solubilidad de los analitos (Wijngaard y col., 2012). De este modo, la temperatura de extracción resulta crítica para este procedimiento, pues teóricamente, temperaturas superiores suponen un rendimiento de extracción mayor. Sin embargo, este factor ha de estudiarse con cautela para evitar efectos negativos en los compuestos termolábiles.

Otros parámetros estudiados de la PLE, como la presión de extracción, ejercen un efecto casi nulo sobre el proceso de extracción siempre que los disolventes se mantengan en estado líquido. Sin embargo, con respecto al tiempo de extracción, existe disparidad en los datos encontrados en la bibliografía. En este sentido, algunos autores indican que la importancia de este parámetro se hace latente sólo cuando se aplican diversos ciclos de extracción estáticos, aunque en ocasiones, un ciclo de extracción resulta suficiente (Herrero y col., 2013), mientras que otros autores señalan que este parámetro se hace significativo cuando se aplican elevadas temperaturas de extracción (Arapitsas y Turner, 2008; Wijngaard y col., 2012).

Finalmente, otro parámetro importante a considerar durante las extracciones PLE es el disolvente empleado para dicho proceso. La aplicación de temperatura junto con presiones moderadas puede provocar cambios en las propiedades físico-químicas de los disolventes utilizados, especialmente en la constante dieléctrica de los mismos (ϵ), la cual se puede considerar como una medida de la polaridad del solvente. En este sentido, la constante dieléctrica del agua a elevadas temperaturas y presiones moderadas decae bruscamente, pudiendo llegar a actuar como el etanol o la acetona, permitiendo así la extracción de compuestos de polaridad media y baja (Carabias-Martínez y col., 2005). Este aspecto es importante si se pretenden realizar extracciones PLE mediante disolventes tipo GRAS (Generally Recognized As Safe) (generalmente etanol, agua o mezclas de ambos).

La técnica de PLE ha sido empleada en la obtención de extractos fenólicos, mediante diferentes condiciones de extracción, a partir de manzanas, uvas y sus subproductos, lúpulo, plantas aromáticas, algarrobo, té, microalgas y soja. Entre los disolventes comúnmente empleados para llevar a cabo dichos extractos se encuentran el metanol, el agua, el etanol y la acetona, con condiciones de temperatura variables entre los 40 °C y los 170 °C y con tiempos de extracción situados, generalmente, entre los 5 y los 10 minutos (Carabias-Martínez y col., 2005; Arapitsas y Turner, 2008; Wijngaard y col., 2012). Sin embargo, el empleo de mezclas de estos solventes con el agua han mostrado ser más efectivas para la extracción de los compuestos fenólicos que en forma pura (Papagiannopoulos y col., 2004; Makris y col., 2007).

En este sentido, los resultados obtenidos por diversos autores indican que las mejores condiciones de extracción pueden alcanzarse, para esta metodología, tanto a bajas temperaturas (Alonso-Salces y col., 2001; Çam y Hışıl, 2010) como a temperaturas elevadas (Arapitsas y Turner, 2008; Wijngaard y col., 2012), lo que sugiere que la temperatura óptima de extracción depende por tanto, de la matriz considerada.

Asimismo, al analizar en la bibliografía la capacidad de esta técnica de extracción puede observarse que diversos autores apuntan a una mayor eficacia de extracción de compuestos fenólicos con respecto a las extracciones convencionales. En este sentido, Delgado-Torre y col., (2012) llevaron a cabo un estudio comparativo entre la eficacia de extracción por PLE, UAE y MAE a partir de sarmientos de la vid, donde observaron que mediante la PLE se obtenían extractos con un contenido total de compuestos

fenólicos notablemente superior al de las otras dos técnicas. Igualmente, Piéiro y col., (2003) observaron que para extracciones de pepitas de uva con metanol y etanol, la técnica de PLE permitía una mayor recuperación de catequina y epicatequina comparado con SLE o UAE.



2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de extractos.

2.1.1. Extractos procedentes de uvas.

Para este estudio se utilizaron 26 variedades de uva procedentes de la colección de cultivos de Bodegas Torres S.A. (Villafranca del Penedès, Barcelona), pertenecientes a las vendimias del 2007 y 2008. En la Tabla 2 se detalla la correspondencia entre el nombre de la variedad analizada y la abreviatura utilizada en este estudio.

Tabla 2. Variedades de uva blanca y tinta empleadas en el estudio y abreviaturas empleadas.

<i>VARIEDADES BLANCAS</i>		<i>VARIEDADES TINTAS</i>	
<i>Nombre</i>	<i>Código</i>	<i>Nombre</i>	<i>Código</i>
Albariño	AL	Belsa	BE
Chardonnay	CH	Bobal	BO
Chenin Blanc	CB	Cariñena	CA
Garnacha Blanca	GB	Cabernet Franc	CF
Macabeo	MC	Cinsault	CI
Moscatel Alexandría	MA	Garnacha Negra	GN
Parellada	PA	Garró	GA
Sauvignon Blanc	SB	Mencía	ME
Viognier	VI	Merlot	MT
Xarel.lo	XA	Pinot Noir	PN
		Syrah	SH
		Tannat	TA
		Tempranillo	TE
		Touriga Nacional	TN
		Zinfandel	ZF

Una vez eliminado el raspón, a partir de cada variedad de uva se obtuvieron dos tipos de extractos, uno acuoso y otro etanólico al 12%. En ambos casos se partió de aproximadamente 25 g de uva, realizándose un duplicado de cada uno de los tipos de extracto. Asimismo, se tomaron dos alícuotas de cada uno, analizándose por separado. De esta manera, se realizaron 4 repeticiones para cada tipo de extracto.

- Extractos acuosos

Para la obtención de los extractos acuosos se trituraron los 25 g de uva entera en un Ultraturrax (IKA-T18 Basic) a 15.000 rpm durante 20 segundos. Posteriormente, se centrifugó a 5 °C y 4.000 rpm durante 30 minutos, separando el sobrenadante por decantación y midiéndose el volumen de extracto obtenido. A continuación se filtró con un filtro de nylon de 0.45 µm (Teknokroma, España) y se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

- Extractos etanólicos

Para la obtención de los extractos etanólicos y teniendo en cuenta el volumen obtenido en los extractos acuosos, se añadió etanol absoluto a la muestra (25 g de uva entera) de tal manera que el contenido en etanol del extracto final fuera del 12%. A continuación se trituró la muestra con un Ultraturrax a 15.000 rpm durante 20 segundos. Posteriormente, se incubó en un baño de aire (Stuart S150, España) protegido de la luz durante 2 horas a 45 °C con una agitación de 200 rpm. Finalizada la incubación, se sometió al extracto a una centrifugación en frío a 5 °C y 4.000 rpm durante de 30 minutos. El sobrenadante se separó por decantación y se midió el volumen de extracto obtenido. A continuación se procedió como con las muestras acuosas hasta la posterior utilización de los extractos.

2.1.2. Extractos procedentes de subproductos de la vinificación.

2.1.2.1. Preparación de la materia prima.

Los subproductos de la vinificación, consistentes en raspones, pepitas y hollejos, se obtuvieron a partir de uvas de la variedad Merlot provenientes del IMIDRA (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario), vendimiados en septiembre de 2009. Los raspones se obtuvieron directamente por separación manual de los granos de uva. Las uvas se prensaron lentamente durante 3,5 horas, descartándose el mosto generado. Tras ello, se procedió a un lavado mediante agua en una relación sólido-líquido de 1:1,5, aplicando dos ciclos de lavado. Posteriormente, los hollejos y las pepitas se obtuvieron por separación manual.

Los raspones, pepitas y hollejos obtenidos se secaron en una estufa con aire forzado a 45 °C hasta peso constante. Tras este tiempo, tanto los raspones como las pepitas secos se trituraron en un molino comercial. Para ello, se congelaron bajo N₂ líquido, y se

trituraron, siendo seleccionado un tamaño de partícula inferior a 1mm a través de un tamiz. La muestra obtenida de raspón se guardó a -20°C hasta el momento de su uso. Por otra parte, la muestra de pepitas se sometió a un proceso de desgrasado, empleando el protocolo propuesto por Xu y col. (2010), que consiste en un desgrasado de las pepitas mediante éter de petróleo a través de diversos ciclos de extracción sólido-líquido. Tras el proceso de desgrasado, el residuo sólido obtenido libre de éter se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización.

Los hollejos secos se sometieron a un proceso de desazucarado. Para ello, los azúcares se eliminaron con agua fría (3 – 8 °C) mediante una extracción estática, aplicándose 4 ciclos de extracción de 30 minutos cada uno y en un ratio de 10 mL de agua por cada gramo de hollejo. Los hollejos desazucarados se liofilizaron, trituraron y tamizaron (tamaño de partícula ≤ 1 mm), guardándose la muestra de hollejo obtenida a -20°C hasta el momento de su utilización.

2.1.2.2. Extracción mediante fluidos presurizados (PLE).

- Descripción del protocolo de extracción.

La obtención de los extractos de raspón, pepitas y hollejos mediante líquidos presurizados se llevó a cabo en un equipo ASE 350 (Dionex, Sunnyvale, USA). Para ello, se emplearon celdas de acero de 10 mL de capacidad. En el caso del raspón se mezcló 1 g de muestra con 1 g de tierras de diatomeas (Dionex, Sunnyvale, USA), hasta la homogenización de la mezcla. Para las pepitas y los hollejos, se mezclaron 0,5 g de muestra con 1,5 g de tierras de diatomeas. El empleo de tierras de diatomeas evita la compactación de la muestra cuando ésta se encuentra sometida a elevadas presiones y con ello se evita la formación de canales preferentes para la circulación del líquido extractante, mejorando la transferencia de masa. Como paso previo, en cada una de las celdas se acoplaron dos filtros de celulosa en su zona inferior, cargándose posteriormente con la anterior mezcla sólida. Por último, las celdas ya cargadas con el extracto se sometieron al proceso de extracción. Todos los disolventes empleados se desgasificaron antes de las extracciones mediante una corriente de N₂ (Carbueros Metálicos, España) durante 30 minutos.

Antes de iniciar la extracción estática, las celdas se llenaron con el solvente apropiado hasta que se alcanzó una presión de 1500 psi. Como paso previo a la etapa de

extracción, tuvo lugar una etapa de calentamiento (heat-up time) correspondiente al tiempo mínimo necesario para alcanzar las condiciones de temperatura en el interior de la celda de extracción. Posteriormente se inició la extracción estática a la temperatura y tiempo pertinentes para cada extracción. Durante este tiempo la muestra permaneció en contacto con el disolvente líquido a la temperatura y presión de extracción seleccionadas, permaneciendo todas las válvulas del sistema cerradas. Una vez finalizada la extracción estática, el extracto generado se recogió en un vial, tras lo cual, se aplicó una etapa de lavado de la celda con el mismo disolvente utilizado durante la extracción, añadido en una proporción equivalente al 60% de la capacidad de la celda empleada. Finalmente, los restos de solventes se recuperaron mediante la aplicación de una corriente de N₂ durante 90 segundos (tiempo de purga), recogién dose en los viales de recolección. A continuación el sistema se despresuriza.

El etanol presente en cada uno de los extractos se eliminó por evaporación a vacío en un evaporador IKA RV 10 Controler (IKA, España) y el extracto libre de etanol se liofilizó para obtener un extracto seco. Los distintos extractos obtenidos se guardaron a -20°C.

- Descripción de los diseños experimentales.

Para determinar la influencia de los diferentes factores de extracción en la obtención de extractos PLE de raspón se utilizó un diseño experimental tipo Central Compuesto Rotatorio 2³, con puntos estrella ($\alpha = \pm 1,6879$) y cinco repeticiones en el centro.

Como factores experimentales se estudiaron el porcentaje de etanol:agua como solvente extractante (Et, de 0 a 100 %), la temperatura de extracción (T, de 40 a 120 °C) y el tiempo (t, de 1 a 11 minutos). Estos factores, así como su intervalo, se basaron en estudios previos de extracción de compuestos fenólicos a partir de matrices similares. Otros factores como la cantidad de muestra o la presión de extracción se fijaron de antemano (Šťavíková y col., 2011). En la Figura 9 se muestra un esquema gráfico del diseño experimental central compuesto rotatorio. De este modo, el diseño experimental estudiado se compone de 19 puntos experimentales, constituidos por 8 puntos a dos niveles, 6 puntos estrella y 5 puntos centrales. La tabla de experimentos fruto del diseño realizado se muestra en la Tabla 3. Las variables respuesta del diseño experimental propuesto fueron el rendimiento de extracción, el contenido de compuestos fenólicos totales, la actividad antioxidante de los extractos, así como la composición fenólica según el grado de polimerización de los mismos.

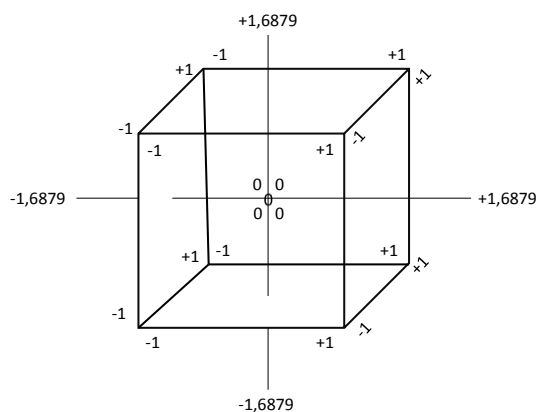


Figura 9. Esquema gráfico del diseño experimental tipo central compuesto rotatorio.

Se propuso el siguiente modelo polinomial cuadrático para las variables respuesta (Y):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 Et + \beta_2 T + \beta_3 t + \beta_{1,1} Et^2 + \beta_{2,2} T^2 + \beta_{3,3} t^2 + \beta_{1,2} EtT + \beta_{1,3} Ett + \beta_{2,3} Tt + \varepsilon$$

Donde β_0 corresponde al término independiente; β_1 , β_2 y β_3 a los coeficientes lineales; $\beta_{1,1}$, $\beta_{2,2}$ y $\beta_{3,3}$ a los coeficientes cuadráticos; $\beta_{1,2}$, $\beta_{1,3}$ y $\beta_{2,3}$ a los coeficientes de la interacción entre los factores y ε al error experimental.

Tabla 3. Matriz del diseño experimental compuesto central rotatorio 2^3 empleado en esta memoria.

	Valores codificados		
	Et	T	t
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,6879	0	0
10	1,6879	0	0
11	0	-1,6879	0
12	0	1,6879	0
13	0	0	-1,6879
14	0	0	1,6879
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0

Los parámetros del modelo se estimaron empleando regresión lineal múltiple (MLR). La calidad del ajuste se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R), la desviación estándar residual (RSD) y el test de falta de ajuste proporcionado por la tabla ANOVA de la regresión.

El efecto de cada término en el modelo y su significación estadística, se analizaron mediante un gráfico de Pareto estandarizado. Los términos que resultaron ser significativamente iguales a cero ($P > 0,05$) se excluyeron del modelo matemático y éste se reajustó mediante MLR. Con ello se pudo obtener la superficie de respuesta, así como las condiciones experimentales que maximizaban cada una de las variables de respuesta utilizadas.

2.1.2.3. Extractos enriquecidos en compuestos fenólicos monoméricos.

La obtención de los extractos enriquecidos en compuestos fenólicos monoméricos se llevó a cabo mediante la aplicación de un sistema de ultrafiltración con membranas asistida por centrifugación. Este sistema consiste en un dispositivo de tubo de centrífuga en cuyo interior se encuentra acoplada una membrana de celulosa de un tamaño de poro equivalente a 10 KDa (Merk Millipore, Alemania). Para ello, 12 mL de extracto a una concentración de 30 mg/mL en metanol:agua (1:1) se depositó en el dispositivo de ultrafiltración. Tras ello, la muestra se mantuvo 4 horas en centrifugación a 20 °C y 5000 rpm, hasta la completa filtración del extracto. Con ello, se obtuvo una fase correspondiente al filtrado (denominada permeado) y otra al retenido. Posteriormente, el metanol se retiró por evaporación a vacío de la fase del permeado. Finalmente, la fase del permeado se liofilizó y guardó a -20°C hasta su posterior utilización.

2.2. Caracterización de compuestos fenólicos.

2.2.1. Determinación de compuestos fenólicos totales (TPC)

Para la determinación del contenido total en compuestos fenólicos se utilizó el método de Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton y col., (1999). Este método consiste en la determinación del contenido fenólico mediante una reacción colorimétrica basada en la reducción del Mo (VI) a Mo (V) por la cesión de un electrón desde el grupo fenol. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (mg de GAE) por L o g de muestra, mediante el uso de una curva de calibrado.

2.2.2. Análisis de la composición fenólica mediante HPLC-RP-DAD.

La composición fenólica individual se determinó a través de HPLC en fase inversa (HPLC-RP-DAD). Para llevar a cabo la identificación y cuantificación fenólica individual de los extractos se empleó un equipo de cromatografía líquida Agilent Infinity 1260, compuesto por un detector de diodo array (DAD) y una bomba cuaternaria. La columna empleada fue una columna de fase inversa C₁₈ tipo ACE RP18-AR de 3 µm de tamaño de partícula, con una longitud de columna de 150 mm y 4,6 mm de diámetro, protegida con una precolumna del mismo material. Tanto la precolumna como la columna se mantuvieron a 30 °C durante todo el análisis. La fase móvil empleada consistió en un gradiente de elución formado por dos componentes: A (solución acuosa de 2 % de ácido fórmico) y B (2 % de ácido fórmico en acetonitrilo). El flujo de la fase móvil se mantuvo constante durante todo el análisis a 1 mL/min. El programa de elución empleado es el que se muestra a continuación:

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
40	96	4
46	91	9
70	86	14
80	79	21
100	60	40
115	0	100
125	0	100
140	100	0

Como paso previo al análisis de los extractos, se llevó a cabo un proceso de purificación de la muestra basado en la eliminación de los compuestos hidrofóbicos presentes mediante una extracción líquido-líquido, aplicado para ello tres ciclos de extracción con hexano. Posteriormente, se eliminó el hexano remanente de la fase acuosa obtenida por evaporación a vacío. Finalmente, la fase acuosa se liofilizó obteniendo una muestra sólida correspondiente a los extractos purificados. Antes de realizar la inyección, todas las muestras fueron filtradas a través de filtros de PVDF de 0,45 µm, empleando un volumen de muestra para el análisis de 40 µL.

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo a través de diferentes longitudes de onda. Así, el análisis se monitorizó a 280 nm para los ácidos hidroxibenzoicos y flavanoles, a 320 nm para los ácidos hidroxicinámicos y estilbenos, a 360 nm para los flavonoles y 520 nm para los antocianos. La identificación y cuantificación de cada compuesto en las muestras se llevó a cabo a través de su comparación con patrones de referencia, obtenidos de Sigma-Aldrich (España) y de Extrasynthese (Francia). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

2.2.3. Análisis de la composición fenólica mediante HPLC-NP-DAD.

El perfil fenólico por familias de compuestos fenólicos según su grado de polaridad se determinó a través de un análisis de HPLC-DAD en fase inversa. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

Para llevar a cabo dichos análisis se empleó el equipo de cromatografía líquida descrito en el apartado anterior. La columna empleada fue una columna de fase normal tipo Kromasil 60 DIOL de 5 µm de tamaño de partícula, con una longitud de columna de 250 mm y 4,6 mm de diámetro, protegida con una precolumna del mismo material, manteniéndose ambas a 35 °C durante todo el análisis. La fase móvil consistió en un gradiente formado por tres componentes. El componente A consistió en una solución de 2 % de ácido acético en acetonitrilo, mientras que la fase B se compuso por 2 % de ácido acético, 3 % agua y 95 % metanol, y la fase C, compuesta por una solución acuosa de 2 % de ácido acético. Se utilizó un flujo constante de fase móvil de 0,8 mL/min durante todo el análisis. El programa de elución empleado se muestra continuación:

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	95	5	0
32	64	36	0
37	55	45	0
49	0	100	0
53	0	100	0
58	0	0	100
62	0	0	100
64	95	5	0
74	95	5	0

Todas las muestras se filtraron a través de filtros de PVDF de 0,45 μm antes del análisis, empleando un volumen de inyección de muestra fue de 10 μL .

Para la identificación de los compuestos fenólicos según su grado de polimerización el análisis se monitorizó a 280 nm, determinándose los monómeros y oligómeros (de 0 a 35 minutos), los polímeros solubles en metanol (de 35 a 46 minutos) y los polímeros solubles en agua (a partir de los 46 minutos). Para la determinación de los antocianos poliméricos se monitorizó el análisis a 520. Los datos se expresaron como mg de catequina por g o L de extracto, a excepción de los polímeros de antociano, que se expresaron respecto a la malvidina.

2.2.4. Determinación de procianidinas poliméricas.

La fracción de procianidinas poliméricas se obtuvo según el método propuesto por Sun y col., (1998). Este método consiste en un sistema de dos minicolumnas conectadas en serie, una minicolumna Sep-Pack tC_{18} en la parte superior y otra C_{18} en la parte inferior, trabajando dicho sistema a vacío a un flujo de solventes aproximado de 2 mL/min. Para cada uno de los extractos se disolvieron 18 mg de extracto purificado en 3 mL de agua Milli-Q, excepto para el extracto de PLE de hollejos, donde se disolvieron 40 mg de extracto en 3 mL. Posteriormente, el pH se ajustó a un valor de 7 mediante la adición de de NaOH 1M y un tampón fosfato 0,3 M (pH 7,0). Para acondicionar las columnas, estas se activaron con 10 mL de metanol y, posteriormente, se acondicionó a un pH neutro por adición de 10 mL de tampón fosfato pH 7,0. Posteriormente, las muestras se cargaron al sistema de columnas y la elución se llevó a cabo inicialmente con 10 mL de tampón fosfato diluido (1/8) y posteriormente 5 mL de agua Milli-Q, eliminándose así los ácidos fenólicos. Tras ello, se adicionaron 25 mL de acetato de etilo para retirar conjuntamente las catequinas monoméricas y procianidinas oligoméricas, acompañadas por otros compuestos fenólicos de bajo peso molecular. Finalmente, la fracción de procianidinas poliméricas se obtuvo por adición de 10 mL de metanol. Posteriormente, el metanol se eliminó por evaporación a vacío, manteniendo la fracción de procianidinas poliméricas a -20°C hasta el momento de su uso. El método de fraccionamiento se aplicó por duplicado para cada uno de los diferentes extractos.

La cuantificación de la fracción de proantocianidinas poliméricas se llevó a cabo mediante el método de la vainillina adaptado por Sun y col., (1998). Este método se basa en la reacción de condensación entre la vainillina y las proantocianidinas en un

medio ácido, dando origen a compuestos coloreados de un rosa intenso. La determinación de procianidinas poliméricas en las muestras se realizó por triplicado, expresándose los resultados como mg de catequina/ g de extracto seco.

2.2.4.1. Determinación del grado de polimerización de la fracción de procianidinas.

La obtención conjunta de las procianidinas oligoméricas y poliméricas se llevó a cabo empleando el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior, hasta la adición del acetato de etilo, que se sustituyó por la adición de 25 mL de éter dietílico con objeto de eliminar las catequinas. A continuación, se obtuvo la fracción conjunta de las procianidinas poliméricas y oligoméricas mediante la adición de 15 mL de metanol. Finalmente, el metanol se eliminó por evaporación a vacío, manteniéndose dicha fracción a -20°C hasta el momento de su utilización.

Para llevar a cabo la identificación de la composición de la fracción de proantocianidinas poliméricas empleó un método de hidrólisis ácida mediante el reactivo de tolueno- α -tiol. La hidrólisis de la fracción de procianidinas se llevó a cabo a través del método propuesto por Prieur y col. (1994). La fracción conjunta de procianidinas oligoméricas y poliméricas se disolvió en 1 mL de metanol y posteriormente fue filtrada por 0,45 μ m. En una ampolla de vidrio especial para moldeado se introdujeron 25 μ L de muestra y 25 μ L de reactivo tolueno- α -tiol (0,83 mL de HCl junto con 2,5 mL de tiol, completando el volumen con metanol hasta alcanzar los 50 mL). Posteriormente, la mezcla se homogenizó suavemente y se produjo el sellado de la ampolla de vidrio mediante calor por contacto directo a la llama. Rápidamente, la ampolla se introdujo en un baño de agua a 90 °C, manteniéndose durante 2 minutos exactos. Tras este tiempo, la ampolla se enfrió rápidamente en un baño de hielo, tomándose 10 μ L de volumen de mezcla para su análisis cromatográfico.

La determinación de los productos de hidrólisis obtenidos se llevó a cabo en un equipo HPLC Hewlett-Packard 1050, acoplado a una bomba cuaternaria y detector de Uv-visible (Hewlett-Packard, Alemania). Se empleó una columna LiChrospher 100 RP-18, de dimensiones 250 mm x 4 mm, con un diámetro de partícula de 5 μ m, y protegida por una precolumna del mismo material. La columna se mantuvo termostata a 30 °C durante todo el análisis. La fase móvil empleada consistió en un componente A (solución acuosa de 2 % de ácido fórmico) y el componente B (2 % de ácido fórmico, 80% acetonitrilo y 18 % agua), con un flujo constante de 1 mL/min. La determinación de

los productos de hidrólisis se llevó a cabo a 280 nm. El volumen de inyección fue de 10 μL de producto de hidrólisis resultante para la fracción conjunta de procianidinas poliméricas y oligoméricas. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. El programa de elución para el análisis es el que se muestra a continuación:

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
40	70	30
60	50	50
70	20	80
75	0	100
90	0	100
100	95	5

2.2.5. Determinación del porcentaje de color polimérico de antocianos.

La determinación del grado de polimerización de los antocianos presentes en los extractos PLE provenientes de hollejos se llevó a cabo mediante el método de Giusti y Wrolstad, (2001). Este método se basa en la diferencia de densidad óptica presente en la muestra sin adulterar y la muestra tratada con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, el cual provoca el blanqueamiento de los antocianos monoméricos.

En una placa de 96 pocillos (Costar, Corning, España) se adicionaron 168 μL de muestra previamente diluida en un tampón de KCl 0,025 M (con un valor de absorbancia a 520 nm inferior a 1). Posteriormente, se adicionaron 12 μL de una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a una concentración 0,9 M (Panreac, España), y se deja reaccionar durante 15 minutos. A la vez, se establecieron pocillos donde se adicionó la muestra adecuadamente diluida junto con 12 μL de agua Milli-Q (blancos). Tras este tiempo, la absorbancia se determinó a las longitudes de onda de 420 nm, 520 nm y 700 nm. Finalmente, teniendo en cuenta la dilución previamente realizada para la muestra, el porcentaje de color polimérico se determina por la fórmula que a continuación se detalla:

$$\% \text{ Color Polimérico} = \frac{\text{Color Polimérico}}{\text{Densidad de Color}} \times 100$$

Donde:

Color polimérico = $([\text{Abs}_{420} - \text{Abs}_{700}] + [\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700}])$ de las muestras

Densidad de color = $([\text{Abs}_{420} - \text{Abs}_{700}] + [\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700}])$ de los blancos

2.3. Determinación de la actividad antioxidante.

La determinación de la actividad antioxidante de las muestras se llevó a cabo mediante el empleo de tres métodos, los cuales se detallan a continuación.

2.3.1. Método del radical ABTS^{•+}.

Este método se consiste en una reacción colorimétrica basada en la reducción del radical catiónico ABTS^{•+} en presencia de un compuesto con actividad antioxidante. Para ello se empleó el protocolo descrito por Re y col., (1999). Este mismo procedimiento se realizó con un patrón de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilmecromano-2-carboxílico 97%, Sigma-Aldrich, España) disuelto en etanol. Los resultados se expresaron como valor TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, esto es, mmol de trolox/L o g de extracto). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

2.3.2. Método del radical DPPH[•].

La determinación de la actividad antioxidante de los extractos mediante el método del radical DPPH[•] se realizó de acuerdo con el método propuesto por Brand-Williams y col., (1995). Para ello, se preparó una solución de trabajo consistente en una solución de $6,1 \cdot 10^{-5}$ M de DPPH (Sigma-Aldrich, España) en metanol. La reacción se inició al mezclar 975 μL de dicha solución con 25 μL de muestra adecuadamente diluida o de solución de trolox. La reducción del radical se monitorizó a través de la pérdida de absorbancia a 517 nm a temperatura ambiente, permitiendo la evolución de la reacción en oscuridad hasta alcanzar la completa reacción de la muestra (tiempo de equilibrio). Para la realización de los controles, 25 μL del disolvente se adicionó a la solución de trabajo. Todas las muestras se realizaron por duplicado a cuatro concentraciones diferentes. Los resultados se expresaron como valor TEAC (mmol de trolox/L o g de extracto).

2.3.3. Método de ORAC.

La determinación de la actividad antioxidante por el método de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Huang y col., (2002) con breves modificaciones. La solución de trabajo constituyó de una disolución de fluoresceína disódica $8 \cdot 10^{-8}$ M (Sigma-Aldrich, España) en un tampón fosfato 0,075 M. Como solución generadora de radicales peroxilo se preparó una solución de 165,94 mM de AAPH (Sigma-Aldrich, España) en tampón fosfato 0,075 M a 37 °C. Dicha solución se preparó exactamente en el momento de su utilización.

Para llevar a cabo la reacción, se adicionaron 150 μ L de solución de fluoresceína en una placa especial para fluorescencia Microfluor 2 de 96 pocillos y fondo redondo (Thermo Science, España), junto con 25 μ L de tampón fosfato (blancos), muestra diluida apropiadamente en tampón fosfato o solución de trolox. La reacción se inició mediante la adición de 25 μ L de solución de AAPH fresca a 37 °C. Tras el inicio de la reacción, la intensidad de fluorescencia se monitorizó durante 120 minutos mediante un lector de placas Infinite M200 (Tecan, Suiza), fijando la longitud de onda de excitación a 485 nm y la de emisión a 520 nm. En los puntos control, no se adicionó solución de AAPH, componiéndose por tanto con 150 μ L de solución de fluoresceína y 50 μ L de tampón fosfato. Tras este tiempo, se determinó el área bajo la curva (AUC) de cada una de las muestras, y a cada una de ellas se sustrajo el valor de AUC del blanco, obteniendo el valor de AUC-neto. Dicho valor se interpoló en la recta del trolox, expresándose los resultados como μ moles de trolox/ g de extracto. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

2.4. Determinación de la actividad antiinflamatoria

2.4.1. Cultivos celulares.

La actividad antiinflamatoria de los extractos se estudió utilizando la línea celular de monocitos THP-1 (TIB-202, American Type Culture Collection (ATCC), España).

Durante el mantenimiento y expansión del cultivo celular se empleó como medio de cultivo el RPMI 1640, suplementado al 10 % de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin, 1 % de HEPES, 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, España) y 0,05 mM de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, España). El cultivo de monocitos en suspensión se mantuvo a una densidad en torno a $2 - 9 \times 10^5$

células/mL en un incubador (Binder, Alemania), en condiciones constantes de temperatura, 37 °C y 5 % de CO₂. Para los ensayos realizados, se han empleado células con hasta 25 reemplazos de medio de cultivo.

Con el fin de diferenciar los monocitos a macrófagos a la suspensión celular se le adicionó PMA (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a una concentración de 100 ng/mL, siendo necesario un periodo de incubación de 48 horas para alcanzar la completa diferenciación celular (Takashiba y col., 1999).

2.4.2. Ensayos de citotoxicidad.

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo empleando el método de respiración mitocondrial dependiente de la reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ol)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), por la enzima mitocondrial succinato-dehidrogenasa, que transforma el MTT en un compuesto coloreado azul, el formazán. La cantidad de células viables va a ser, por tanto, proporcional a la cantidad de formazán producido (Mosmann, 1983).

Para determinar la toxicidad celular de todos los extractos empleados se utilizaron placas de 24 pocillos, con 5×10^5 macrófagos por pocillo, donde se adicionaron distintas concentraciones de los extractos empleados a lo largo del estudio. El tratamiento se mantuvo durante 24 horas y transcurridas éstas, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y a continuación se adicionaron 0,5 mL de una disolución de 0,5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich, España) que se mantuvo en contacto con las células durante 3 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Con el propósito de determinar la cantidad de formazán producido por las células, se llevó a cabo su lisis mediante el empleo de una solución compuesta por la mezcla de dimetil sulfóxido (DMSO) (Panreac, España) y etanol en proporción 1:1, midiéndose a continuación la absorbancia de cada uno de los pocillos a 540 nm en un lector de microplacas Sunrise Remote (Tecan, Suiza). La densidad óptica del formazán producido por las células en los pocillos control, donde no se ha añadido ningún extracto, se determinó como la máxima viabilidad, comparándose con la absorbancia del resto de tratamientos.

2.4.3. Medida de la actividad antiinflamatoria.

Para determinar la actividad antiinflamatoria se emplearon macrófagos diferenciados a partir de monocitos THP-1 como se indicó previamente.

Con objeto de simular en los macrófagos una situación patológica de inflamación, se llevaron a cabo dos procedimientos diferentes. Por un lado, se adicionaron 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS (Sigma-Aldrich, España), y por otro lado, un segundo modelo de inflamación dependiente de oxidación (Poli y col., 2009). En este segundo modelo, se han incorporado LDLox a las células. Las LDL empleadas fueron donadas por el Servicio de Bioquímica e Investigación del Hospital Ramón y Cajal (Madrid, España). Inicialmente a estas LDL se les eliminó el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), mediante un proceso de diálisis en PBS (Invitrogen, España), a 4 °C y en agitación, a lo largo de una noche (Fuhrman y col., 2008), empleándose para ello membranas de diálisis de 2000 Da con 1 mL de volumen (Float-A-Lyzer G-2, Spectrum Laboratories Inc., Francia). A continuación, se oxidaron las LDL siguiendo el protocolo descrito por Steinbrecher, (1987) que, de forma resumida, consistió en preparar una disolución de LDL con 5 μM de CuSO_4 (Sigma-Aldrich, España) e incubarlo durante 3 horas en agitación a 37 °C. Con el propósito de determinar la correcta oxidación de las LDL, una vez finalizado el periodo de incubación, se determinó el grado de oxidación mediante el método de TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), empleando la modificación del método descrito por Yancey y Jerome, (1998); los resultados se expresaron como equivalentes de malondialdehído (MDA) en nmoles MDA/mg de LDL. Una vez comprobada la correcta oxidación de las LDL, se adicionan al medio de cultivo 75 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox. Los macrófagos estimulados tanto con LPS como con LDL se consideraron como controles positivos. En este sentido, los controles negativos de los ensayos se caracterizaron por macrófagos sin estimular, que representarían la situación basal. Los distintos extractos se adicionaron a la vez que el LPS o las LDLox, manteniéndose los tratamientos durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO_2 . Transcurridos los tiempos de incubación, se recogió el medio de cultivo y se almacenó a -20°C para la posterior determinación de la secreción de citoquinas.

2.4.4. Ensayo de ELISA para la cuantificación de citoquinas.

La cuantificación de la cantidad de citoquinas secretadas por los macrófagos al medio de cultivo, tras el tratamiento con los extractos, y activadas bien con LPS o con LDLox, se determinó empleando el enzoinmunoensayo (ELISA). Con este propósito se utilizó un kit de ELISA tipo sándwich siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Biosciences, España). En este ensayo se ha determinado la secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos (Microtest, BD Falcon, España), tratadas específicamente para permitir la adhesión del anticuerpo primario de cada una de las citoquinas cuya concentración se determinó. A cada pocillo se añadieron 100 μ L de la solución de anticuerpo primario incubándose durante la noche a 4 °C. A continuación, se lavó la placa y se acondicionó durante una hora. Posteriormente, se adicionaron en la placa las muestras que forman las curvas patrón de las distintas citoquinas a estudiar (100 μ L) y las muestras procedentes de los ensayos de actividad antiinflamatoria. De las muestras procedentes del modelo de inflamación utilizando macrófagos activados por LPS se incorporaron 10 μ L para la determinación de TNF- α , 10 μ L para IL-1 β , 20 μ L para IL-6 y 100 μ L para IL-10, mientras que para el modelo dependiente de oxidación los volúmenes empleados fueron de 40 μ L para TNF- α , 60 μ L para IL-1 β , 80 μ L para IL-6 y 100 μ L para IL-10.

Las muestras y las rectas patrón se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, se realizaron los lavados en las placas y se incorporaron 100 μ L de la solución de anticuerpo secundario junto con la enzima que va a permitir la cuantificación de la citoquina. Tras una hora de incubación en oscuridad del anticuerpo secundario y la enzima, se realizó una nueva etapa de lavado y se incorporaron 100 μ L de la solución de sustrato de la enzima, que da lugar a un compuesto coloreado. Tras 30 minutos de tiempo de reacción, ésta se detiene incorporando en los pocillos 50 μ L de H₃PO₄ 1 M (Sigma-Aldrich, España). Finalmente, se determinó la absorbancia de los pocillos a 450 nm, con una corrección a 570 nm en un lector de placas. Los resultados se cuantificaron como pg de citoquina/mL de medio de cultivo. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

2.5. Biodisponibilidad *in vitro*.

Los estudios de biodisponibilidad *in vitro* se llevaron a cabo con el propósito de simular los procesos de digestión y absorción intestinal que tienen lugar *in vivo* y constaron de las siguientes etapas: inicialmente una digestión *in vitro*, seguida de una absorción intestinal *in vitro*.

2.5.1. Digestión *in vitro*.

2.5.1.1. Extractos de uva.

El proceso de digestión se llevó a cabo a partir de los extractos etanólicos de uvas, de donde se tomó una alícuota que constituyó la fase inicial. A 9 mL de extracto se le adicionó 3 mL de saliva humana y se agitó la mezcla durante 30 (fase bucal). Posteriormente, se ajustó a un pH de 2 con ácido clorhídrico y se adicionó 700 μ L de solución estomacal consistente en 10 mg de pepsina porcina (Sigma-Aldrich, España) en 1 mL de ácido clorhídrico 0,1 M (315 U/mL). La mezcla protegida de la luz se mantuvo en un baño de aire 2 horas a 37 °C con una agitación de 90 rpm (fase estomacal).

Tras este tiempo, la digestión se ajustó hasta un pH de 6 con NaHCO_3 en concentración 1 N. Posteriormente, se adicionaron 2,25 mL de una solución intestinal consistente en 9 mg de pancreatina y 56,25 mg de sales biliares disueltas en 2,25 mL de NaHCO_3 1 N. Tras ello, se ajustó nuevamente el pH a 7,5 mediante NaHCO_3 en concentración 1 N y se mantuvo 2 horas a 37 °C a 90 rpm (fase intestinal). El resto de la digestión se centrifugó a 4000 rpm a 20 °C durante 10 min, tomando el sobrenadante (fase final).

2.5.1.2. Extractos de PLE.

La digestión de los diferentes extractos de PLE se llevó a cabo mediante una modificación del protocolo de Martín y col., (2010). Para ello, se preparó una disolución de extracto a una concentración de 30 mg/mL en agua Milli-Q, excepto para el extracto etanólico de raspón, que se disolvió en etanol puro. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos, donde se tomó el (muestra inicial).

A 5 ml del anterior sobrenadante se adicionaron una solución salival a 37 °C, consistente en una disolución de 9,3 mg de α -amilasa salival humana tipo XIII-A en

cloruro cálcico 1mM (Sigma-Aldrich, España). La mezcla se vortizó durante 30 segundos y se mantuvo 2 minutos a 37 °C (fase bucal).

Para llevar a cabo la digestión estomacal e intestinal se empleó un titulador Titrino Plus 877 (Metrohm, Suiza), compuesto por un vaso cónico de doble camisa acoplado a un agitador magnético y relleno por una corriente de agua a 37 °C. El titulador se compone de un electrodo que controla el pH de la solución de estudio y un dosificador de solución tituladora, en este caso, NaOH 0,1 M. Tras la fase bucal, se adicionaron 25 mL de una solución gástrica, compuesta por 127 mg de pepsina porcina de mucosa gástrica (536 U/mg, Sigma Aldrich, España) disuelta en 25 mL de agua ácida ajustada a pH 2 con ácido clorhídrico. La mezcla gástrica se mantuvo en agitación a 37 °C durante una hora, protegida de la oscuridad (fase estomacal).

Por último, la digestión se ajustó a un pH de 7,5 y se adicionó una solución pancreática compuesta por 9,7 mg de pancreatina (Sigma Aldrich, Madrid, España) en 2,8 mL de buffer trizma-maleato 10 mM, que se mantuvo en agitación durante 2 horas a 37 °C (fase intestinal). Durante las dos horas de digestión, el pH fue monitorizado y mantenido a pH 7,5 por adición de solución tituladora. Una vez finalizada la digestión intestinal, la digestión se filtró por un filtro de 0,45 µm de PVD (Symta, España) y posteriormente se liofilizó, guardándose las muestras a -20°C.

2.5.2. Absorción intestinal *in vitro*.

La determinación de la absorción intestinal de los digeridos se llevó a cabo utilizando la línea celular Caco-2 (Invitrogen, España), procedente de adenocarcinoma de colon humano. Las células se mantuvieron en medio Eagle's modificado Dubelcco's (DMEM) con un alto contenido en glucosa (4,5 g/L) y suplementado con un 10 % de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 1 % de HEPES y 2 mM de L-glutamina.

En una etapa previa a la realización de los ensayos de absorción, se determinó la toxicidad de los diferentes digeridos en monocapas de células Caco-2, donde se empleó un método análogo al descrito previamente para la determinación de la toxicidad de los extractos frente a los macrófagos procedentes de la línea celular THP-1, el método dependiente de la reducción del MTT.

Para los ensayos de absorción se utilizaron células Caco-2 entre los pases 30 y 45, que se cultivaron en placas especiales de 6 pocillos (Transwell® Costar, Corning, España). Estas placas constan de un cestillo interior con una membrana semipermeable de poliéster en el fondo, dentro de un pocillo de mayor volumen, simulando la zona apical y basolateral de las monocapas de enterocitos intestinales, una vez que las células recubren por completo la superficie de la membrana (Figura 10).

Las células Caco-2 se sembraron en una densidad de 5×10^5 células sobre la membrana contenida en el soporte de cada pocillo (tamaño de poro $0,4 \mu\text{m}$, 24 mm de diámetro y $4,67 \text{ cm}^2$ de superficie de crecimiento), añadiendo 1,5 mL de medio de cultivo en la zona apical y en la basolateral, 2,6 mL. El medio de cultivo se reemplazó cada dos días, permitiendo que las células crecieran sobre la membrana cubriendo toda su superficie, en monocapa, y que posteriormente se diferenciaron formando el borde en cepillo característico de los enterocitos intestinales. Este proceso duró aproximadamente 21 días.

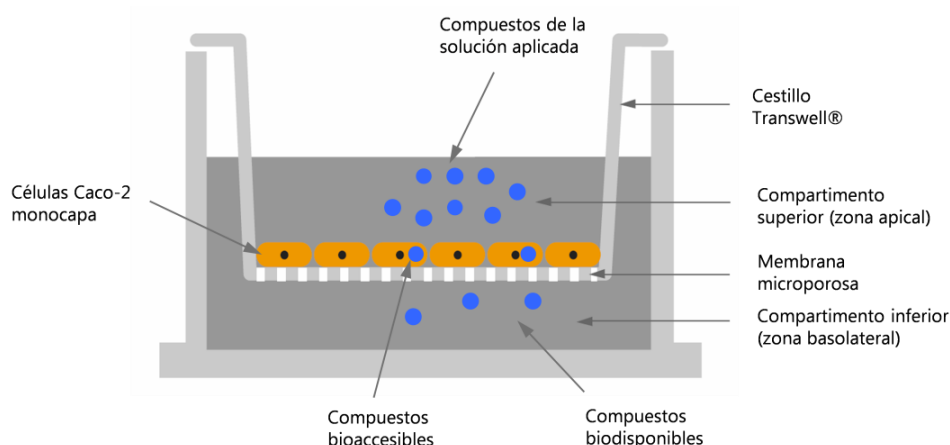


Figura 10. Esquema de un pocillo de las placas Transwell® donde las células Caco-2 crecen sobre una membrana cubriendo toda la superficie y dejando separados los compartimentos apical y basolateral.

En una etapa previa a la realización de los ensayos de absorción, se evaluó la integridad de la monocapa de células midiendo el potencial transmembrana (TEER). Únicamente se realizaron los ensayos de absorción cuando la medida del TEER era superior a $300 \Omega\text{cm}^2$ e inferior a $800 \Omega\text{cm}^2$.

- Medida del potencial transmembrana (TEER).

La medida del TEER se empleó para determinar la integridad de las monocapas celulares mediante el uso de un aparato específico, que consiste en unos electrodos

especiales acoplados a un voltímetro (Evon World Precision Instruments, Sarasota, FL, EEUU). Estos electrodos, por su diferente longitud, permiten que el electrodo más largo se coloque sobre el fondo del compartimento basolateral, mientras que el electrodo más corto, se introduce en el compartimento apical, no rozando la monocapa de células (Figura 11). Previamente a la realización de la medida, los electrodos se esterilizaron por inmersión en una solución de etanol al 70 % y posteriormente, para equilibrarlos, se introdujeron en una solución esterilizada de KCl 0,15 M. Como control se midió el TEER de un pocillo que sólo contenía medio de cultivo (sin células), los valores del TEER se expresaron como resistencia por unidad de área, ya que ésta es independiente del área de la membrana utilizada, aplicando la siguiente fórmula:

$$[\text{Resistencia de la monocapa} = \text{Resistencia total} - \text{Resistencia Control}]$$

Dónde Resistencia total es el valor obtenido en un pocillo que contiene células Caco-2 en su correspondiente medio de cultivo y Resistencia control es la resistencia obtenida en un pocillo donde sólo hay medio de cultivo. Así, Resistencia monocapa es el valor debido sólo a la monocapa de células.

$$[\text{Resistencia monocapa} \times \text{Área de la membrana} = \text{Resistencia monocapa} \times \pi d^2/4 (\Omega\text{cm}^2)]$$

En este trabajo, las membranas utilizadas tuvieron un diámetro (d) de 2,4 cm y los pocillos que contienen únicamente medio de cultivo presentaron una resistencia de 80 – 85 Ω . Por ello, se consideró que las monocapas estaban íntegras cuando los valores de TEER obtenidos fueron superiores a 300 Ωcm^2 .

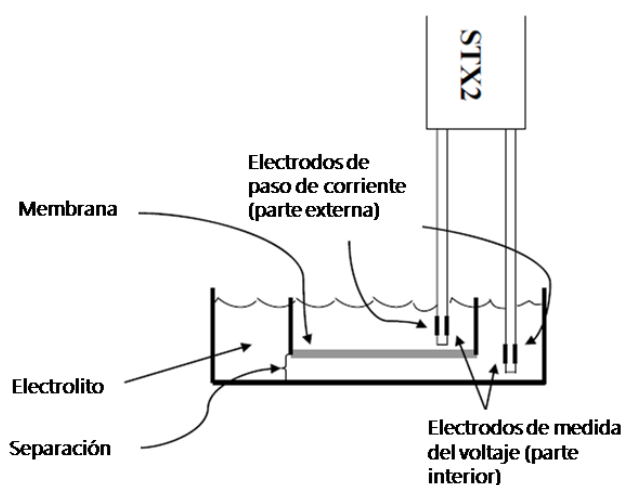


Figura 11. Esquema de la medida del potencial transmembrana.

Una vez que se comprobó la integridad de la membrana y se alcanzó la diferenciación de las células a enterocitos (21 días), se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por PBS. Para ello, se añadió en la zona apical del pocillo el digerido de los diferentes extractos cuya biodisponibilidad se quiso medir, en un volumen final de 1,5 mL, y se adicionó en la zona basolateral 2,6 mL de PBS. Estas placas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, se recogió el medio de cultivo de las zonas apical y basolateral de los pocillos y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

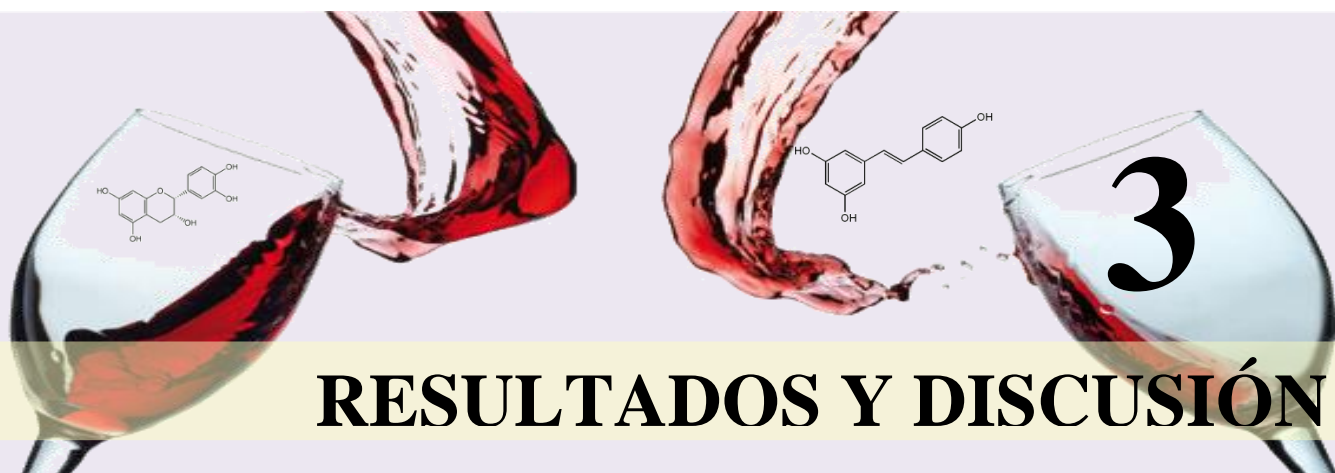
2.6. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el programa SPSS 15.0. La comparación de las diferencias de las medias de los distintos tipos de extractos dentro de una misma añada se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test de comparaciones múltiples de Duncan a un nivel de significación de $p \leq 0,05$. Este mismo análisis se empleó para determinar la comparación de la actividad antioxidante en las diferentes etapas de la digestión.

El análisis de la t de Student se utilizó para la discriminación entre tipos de extractos de uvas (etanólicos y acuosos) o entre diferentes añadas. Las muestras se consideraron significativas (diferentes) cuando $p \leq 0,05$.

Para determinar el nivel de correlación existente entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos se empleó el análisis de Pearson ($p \leq 0,05$). Además, este mismo análisis se empleó para determinar el nivel de correlación existente entre la actividad antioxidante y la composición fenólica de los extractos durante el proceso de la digestión ($p \leq 0,05$).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para los diseños experimentales de los extractos PLE procedentes de subproductos de la vinificación se llevó a cabo mediante el programa Statgraphics Centurion XVI.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Uvas

En el presente estudio y con el fin de determinar la influencia intervietal, respecto a la capacidad antioxidante y contenido en compuestos fenólicos, de cara a la elaboración de un vino con propiedades saludables, se utilizaron 26 variedades de uva diferentes, de las cuales 10 correspondieron a variedades blancas y 16 a tintas. A partir de cada una de ellas, se llevaron a cabo dos tipos de extractos, uno directo (extracto acuoso) y otro con maceración entre el mosto y resto de componentes en presencia de un 12 % de etanol (extracto etanólico).

De manera habitual, la vinificación en blanco se encuentra caracterizada por una ausencia de maceración entre el mosto o el vino y el resto de los constituyentes de la uva. De esta forma, la fermentación alcohólica del mosto tiene lugar en ausencia de hollejos. Por tanto, extrapolando la capacidad antioxidante de los extractos acuosos se podrá obtener una indicación de las variedades más adecuadas para la elaboración de vinos blancos con alta capacidad antioxidante.

Por otro lado, a lo largo del proceso de elaboración del vino tinto, se produce una extracción de los compuestos fenólicos del hollejo favorecida por la presencia del etanol formado durante la fermentación alcohólica (Pinelo y col., 2006). Con el fin de evaluar qué variedades de uva serían las más adecuadas en condiciones de maceración fermentativa con hollejos, se llevó a cabo un pequeño estudio para determinar las condiciones aceleradas más favorables de extracción, aquellas que permitan extraer una mayor cantidad de compuestos fenólicos sin degradarlos, optimizándose el protocolo de extracción propuesto por Jensen y col., (2008). Para ello se utilizaron distintas combinaciones de temperatura y tiempo, llegando a la conclusión de que las mejores condiciones correspondieron a un proceso de maceración a 45 °C, durante 2 horas y con una agitación orbital constante de 200 rpm (datos no mostrados). En todos los casos se añadió un 12 % de etanol al medio de maceración, tomado como el valor estándar de grado alcohólico que suelen presentar los vinos tintos.

Asimismo, con el objetivo de comparar el potencial de las uvas blancas con el de las uvas tintas, se prepararon tanto extractos etanólicos de uvas blancas, como extractos acuosos de uvas tintas.

3.1.1. Caracterización de extractos de variedades de uva blanca

La variedad de uva es el factor que ejerce una mayor influencia en las características químicas y funcionales de los productos obtenidos a partir de la uva. Sin embargo, numerosas publicaciones han puesto de manifiesto la influencia de las condiciones edafoclimáticas y de cultivo de las uvas (zona de cultivo, climatología, estado sanitario de la uva, etc.) en el contenido fenólico que poseen dichas uvas y por ende en las distintas actividades biológicas que presentan (Downey col., 2006; Pérez-Lamela y col., 2007). Por ejemplo, es ampliamente conocido que un aumento en la incidencia de radiaciones ultravioletas, así como de agentes patógenos en la uva, provoca un aumento de los niveles de resveratrol presentes en la misma (Takanayagi y col., 2004). Así, además de los factores genéticos, otros como los ambientales y agronómicos también tienen un papel importante en el contenido y composición fenólica de la uva (Yang y col., 2009). Asimismo, Li y col., (2009) pusieron de manifiesto que incluso dentro de una misma añada pueden producirse diferencias significativas en la actividad antioxidante entre diferentes viñedos de una misma variedad de uva. De esta manera, como reflejan los objetivos planteados en el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de la actividad antioxidante y contenido en compuestos fenólicos de dos añadas consecutivas de uvas, con el fin de determinar qué variedades presentan la mayor actividad antioxidante, eliminando las posibles desviaciones producidas por las condiciones ambientales.

3.1.1.1. Medida de la actividad antioxidante.

- Añada 2007.

La determinación de la actividad antioxidante de los distintos extractos se llevó a cabo mediante el método del radical ABTS^{•+} propuesto por Re y col., (1999). Este método constituye uno de los métodos de referencia más utilizados para el análisis de la actividad antioxidante tanto de compuestos puros como de alimentos, lo que facilita la comparación entre estudios (Cao y col., 1998; Pietta y col., 2000; Pulido y col., 2000; Proteggente y col., 2002; Tabart y col., 2009).

Los resultados obtenidos en la medida de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos y etanólicos de las 10 variedades de uva blanca, expresados como valor TEAC (mmol Trolox/L de extracto), se muestran en la Figura 12 y Tabla A.1 del Anexo.

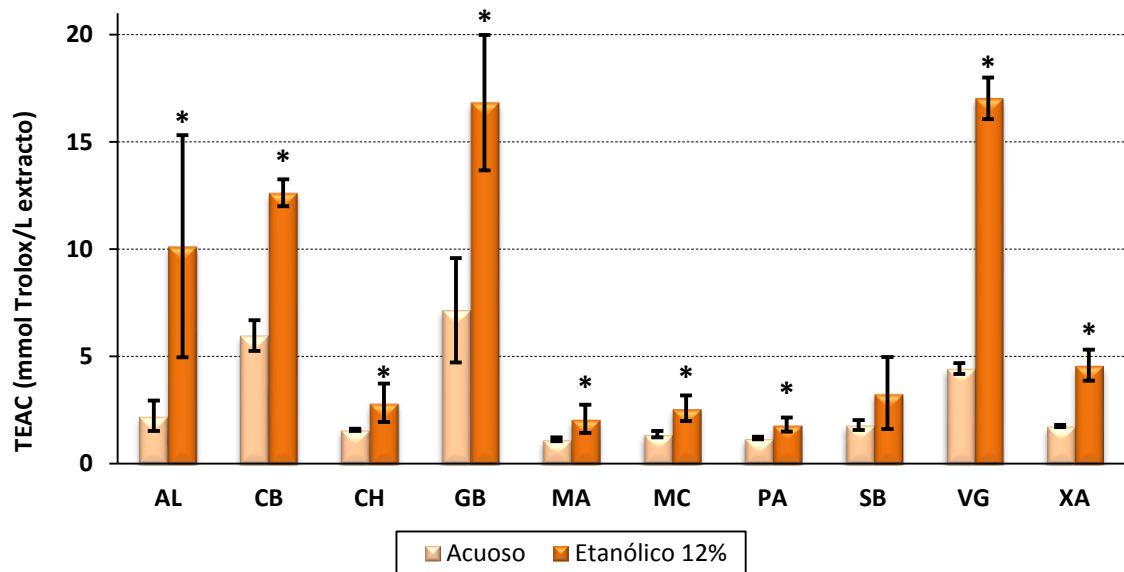


Figura 12. Valor TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de las variedades de uva blanca de la añada 2007. (*) Diferencias significativas entre los dos tipos de extractos ($p \leq 0,05$).

El valor TEAC de los extractos acuosos varió entre $1,13 \pm 0,09$ mmol y $7,15 \pm 2,43$ mmol trolox/L. Las variedades que mostraron una mayor capacidad antioxidante fueron Garnacha blanca, seguida de Chenin blanc y en menor medida Viognier, mientras que el resto de variedades mostraron una actividad menor sin diferencias significativas entre ellas. De esta manera, estas tres variedades se perfilarían como las variedades más adecuadas para la elaboración de un vino blanco con alta capacidad antioxidante.

Por su parte, el valor TEAC de los extractos etanólicos varió entre $1,82 \pm 0,33$ mmol y $17,03 \pm 0,79$ mmol trolox/L (Figura 12). Estos extractos siguen, en general, el mismo patrón que los acuosos en esta añada. De esta manera, los extractos etanólicos más activos resultaron ser los de Viognier y Garnacha blanca, seguidos de Chenin blanc. Por otro lado, las variedades con menor actividad correspondieron a Parellada, seguida de las variedades Moscatel Alexandría, Macabeo, Chardonnay y Sauvignon blanc, que presentaron valores similares entre sí.

Para todas las variedades, excepto para la variedad Sauvignon blanc, la actividad antioxidante de sus extractos etanólicos fue superior a la de sus extractos acuosos. Sin embargo, no todas las variedades mostraron el mismo incremento. Mientras que los extractos de variedades como Moscatel Alexandría, Parellada, Macabeo y Chardonnay sólo mostraron aumentos moderados en el valor TEAC, los extractos etanólicos obtenidos a partir de variedades como Viognier mostraban una actividad antioxidante muy superior a la registrada en los extractos acuosos, situándose en valores TEAC

correspondientes a vinos tintos (Anli y Vural, 2009; Šeruga y col., 2011; Arcari y col., 2013). En este sentido Furham y col., (2001) pusieron de manifiesto cómo un prolongado proceso de maceración o la adición de etanol en un porcentaje entre un 12 % y un 18% con maceración posterior de la uva estrujada, permitía obtener vinos blancos con características antioxidantes similares a las de los vinos tintos.

- Añada 2008.

Con respecto a los valores TEAC de los extractos acuosos correspondientes a la añada 2008 (Figura 13 y Tabla A.2 del Anexo), estos variaron de $0,92 \pm 0,04$ mmol a $14,78 \pm 3,19$ mmol trolox/L, donde las variedades con una mayor actividad antioxidante fueron Garnacha blanca, Chardonnay y Viognier, presentando valores TEAC similares entre ellas. Por otro lado, los extractos de las variedades con menor valor TEAC correspondieron a Macabeo, Moscatel Alexandría, Xarel.lo y Sauvignon blanc, sin diferencias significativas entre sí.

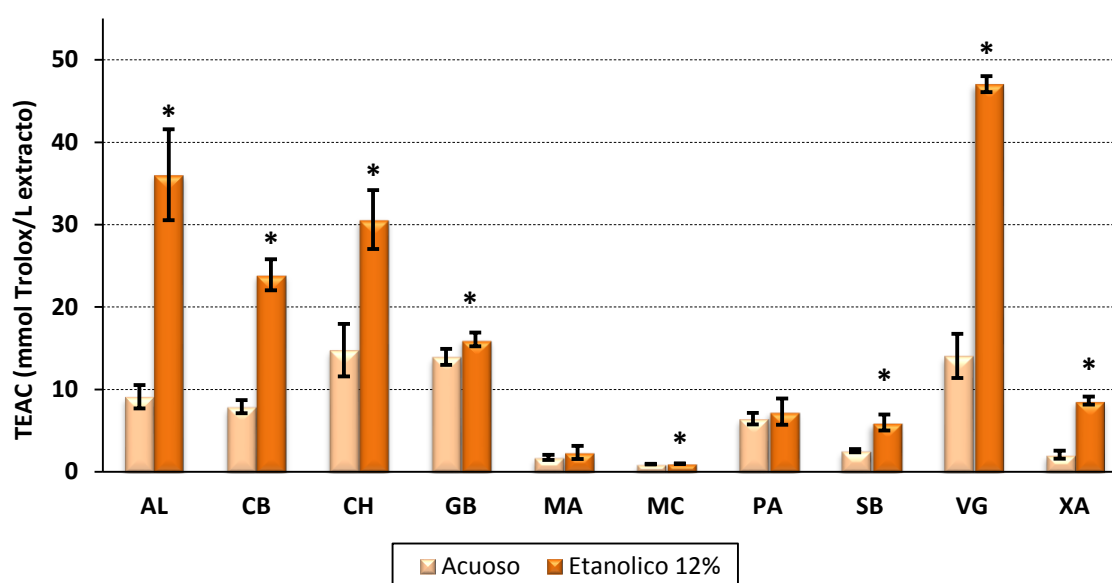


Figura 13. Valor TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de las variedades de uva blanca de la añada 2008. (*) Diferencias significativas entre los dos tipos de extractos ($p \leq 0,05$).

De manera semejante a la añada 2007, los extractos etanólicos de las distintas variedades recogidas en la añada 2008 mostraron valores TEAC superiores respecto a sus correspondientes extractos acuosos, excepto en el caso de Moscatel Alexandría y Parellada. El extracto etanólico de Viognier resultó ser el más antioxidante, seguido del extracto de Albariño y del de Chardonnay. Como ya ocurrió en la añada 2007 los extractos más activos poseían valores TEAC más parecidos a vinos tintos que a vinos

blancos. Por otro lado, Moscatel Alexandría y Macabeo resultaron ser las variedades con menor actividad antioxidante, presentando valores típicos de vinos blancos (Landrault y col., 2001; Arcari y col., 2013).

- Comparación añadas 2007 y 2008.

Si comparamos las añadas 2007 y 2008 respecto a su actividad antioxidante (Figura 14), se observa que existe una importante variación en los valores TEAC tanto en los extractos acuosos como en los etanólicos.

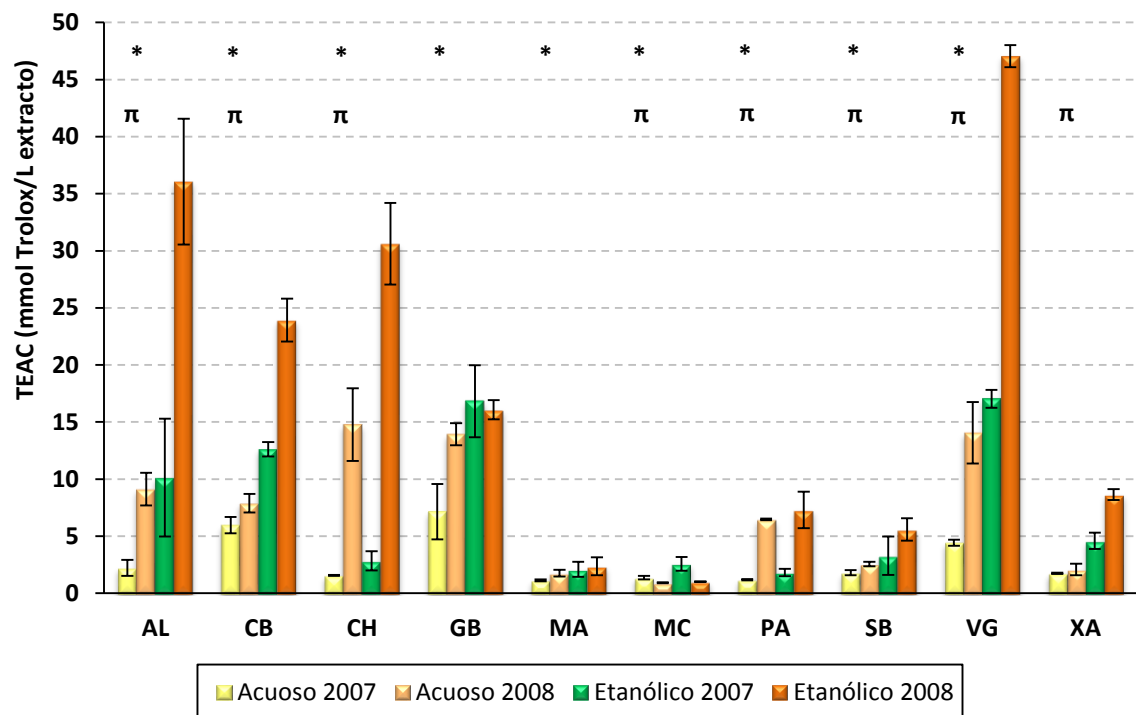


Figura 14. Comparativa del valor TEAC entre añadas de los extractos de las uvas blancas.

(*) Diferencias significativas entre añadas para los extractos acuosos ($p \leq 0,05$).

(π) Diferencias significativas entre añadas para los extractos etanólicos ($p \leq 0,05$).

Los extractos de la vendimia 2008 presentaron, en general, una actividad antioxidante mayor que los extractos de la vendimia 2007. En este sentido, fueron especialmente destacables los aumentos producidos en los extractos de las variedades Chardonnay, Viognier, Albariño y Parellada, mientras que los extractos de variedades como Macabeo, Moscatel Alexandría, Sauvignon blanc, o Chenin blanc mostraron un incremento más moderado o inexistente. De esta manera, en la añada 2007 se registró una variación intravarietal menor en la actividad antioxidante que en la añada 2008.

Existen multitud de publicaciones basadas en la actividad antioxidante de vinos y uvas. Sin embargo, la comparación entre la actividad antioxidante que presentan los extractos de este estudio con valores recogidos en la bibliografía presenta diversas dificultades. Por una parte, la bibliografía relativa a ciertas variedades es escasa o inexistente. Además, la diversidad de metodologías empleadas en la determinación de la capacidad antioxidante dificulta la comparación entre estudios. De esta manera, sólo fue posible establecer una comparación bibliográfica con un reducido número de trabajos.

En general, los extractos acuosos de la añada 2007 presentaron valores TEAC similares a los descritos para vinos blancos; mientras que, en la añada 2008 estos extractos mostraron niveles de capacidad antioxidante superiores a los habituales para este tipo de vinos (Fernández-Pachón y col., 2004; Arcari y col., 2013, Tourtoglou y col., 2014).

Diversos estudios mostraron valores TEAC semejantes a los extractos acuosos de la añada 2007 en vinos monovarietales de Chardonnay y Sauvignon blanc (De Beer y col., 2003; Li y col., 2009); mientras que Landrault y col., (2001) observaron en vinos monovarietales de Chardonnay valores TEAC ligeramente más elevados que los de la añada 2007 e incluso algún vino con una actividad antioxidante ligeramente inferior a la añada 2008. Por otro lado, los extractos acuosos de las variedades Viognier y Chenin blanc mostraron en ambas añadas valores muy superiores a los descritos en la bibliografía (Landrault y col., 2001; De Beer y col., 2003; Li y col., 2009).

3.1.1.2. Determinación de compuestos fenólicos.

- Añada 2007

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó por el método del reactivo de Folin-Ciocalteu. Este método y en menor medida la determinación del índice de compuestos fenólicos totales (IPT), constituyen los dos métodos más empleados en la determinación de los compuestos fenólicos totales en uvas (Iacopini y col., 2008; Pérez-Lamuela, 2007), vinos (Di Majo y col., 2008; Alén-Ruiz y col., 2009) y productos derivados de la uva (Chiou y col., 2007; Cerezo y col., 2010) debido, principalmente, a su rapidez y sencillez. Sin embargo, conviene mencionar que los datos obtenidos mediante la medida del TPC no se pueden considerar como valores absolutos puesto que existen algunos compuestos (azúcares, aminoácidos y ácidos nucleicos, entre otros) que pueden interferir en dicha determinación (Singleton y col., 1999).

Respecto a los extractos acuosos de la añada 2007, los valores se situaron entre $124,01 \pm 22,30$ mg y $660,19 \pm 207,99$ mg de GAE/L (Figura 15 y Tabla A.3 del Anexo). Los extractos acuosos de las variedades Garnacha blanca y Chenin blanc, seguidos de Viognier registraron los mayores TPC, mientras que a partir del resto de variedades se obtuvieron extractos más pobres.

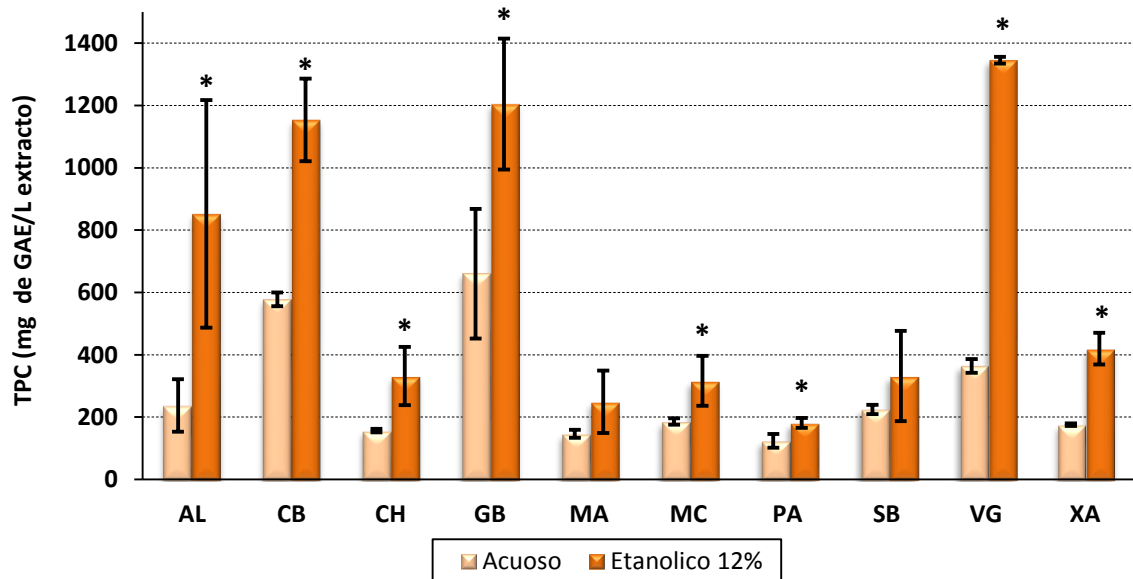


Figura 15. TPC de los extractos acuosos y etanólicos de las variedades de uva blanca de la añada 2007. (*) Diferencias significativas entre los dos tipos de extractos ($p \leq 0,05$).

Los hollejos y las pepitas constituyen la principal fuente de compuestos fenólicos de la uva (Ribéreau-Gayon, 2006; Yemis y col., 2008; Toaldo y col., 2013). De este modo, la maceración hidroalcohólica (etanol al 12%) permitió la obtención de un extracto etanólico formado por compuestos fenólicos propios del mosto, así como de aquellos presentes inicialmente en hollejos y pepitas extraídos durante el proceso de maceración (Villano y col., 2006; Breksa y col., 2010; Toaldo y col., 2013). De esta manera, los extractos etanólicos mostraban un contenido en compuestos fenólicos mayor que los acuosos, con valores comprendidos entre $181,61 \pm 15,80$ mg y $1345,21 \pm 11,02$ mg de GAE/L, excepto para las variedades Sauvignon blanc y Moscatel Alexandría. Sin embargo, al igual que ocurría en la medida de la actividad antioxidante, no todos los extractos etanólicos mostraban el mismo incremento respecto a los extractos acuosos. De esta manera, en variedades como Macabeo o Parellada sólo se produjeron aumentos moderados, mientras que en Viognier la maceración causó una acusada extracción de compuestos fenólicos ($1345,21 \pm 11,2$ mg de GAE/L), situándose en valores de TPC

más próximos a los esperables en un vino tinto (Paixão y col., 2007; Rastija y col., 2009; Hosu y col., 2014). En este sentido, también destacan los extractos etanólicos de las variedades Chenin blanc, Garnacha blanca y Albariño, aunque en menor medida que Viognier. Asimismo, la extracción hidroalcohólica produjo en el resto de variedades unos extractos de bajo contenido en compuestos fenólicos. De este modo, podemos concluir que las variedades que presentaron los valores de TPC mayores fueron Viognier, Garnacha blanca y Chenin blanc.

- Añada 2008.

El TPC de los extractos acuosos de la añada 2008 (Figura 16 y Tabla A.4 del Anexo) osciló entre $89,52 \pm 5,05$ mg y $1323,89 \pm 391,75$ mg de GAE/L, destacando variedades como Viognier, Chardonnay y Garnacha blanca por su alto contenido en compuestos fenólicos totales. Por el contrario, con las variedades Macabeo, Moscatel Alexandría, Sauvignon blanc y Xarel.lo se obtuvieron los extractos más pobres.

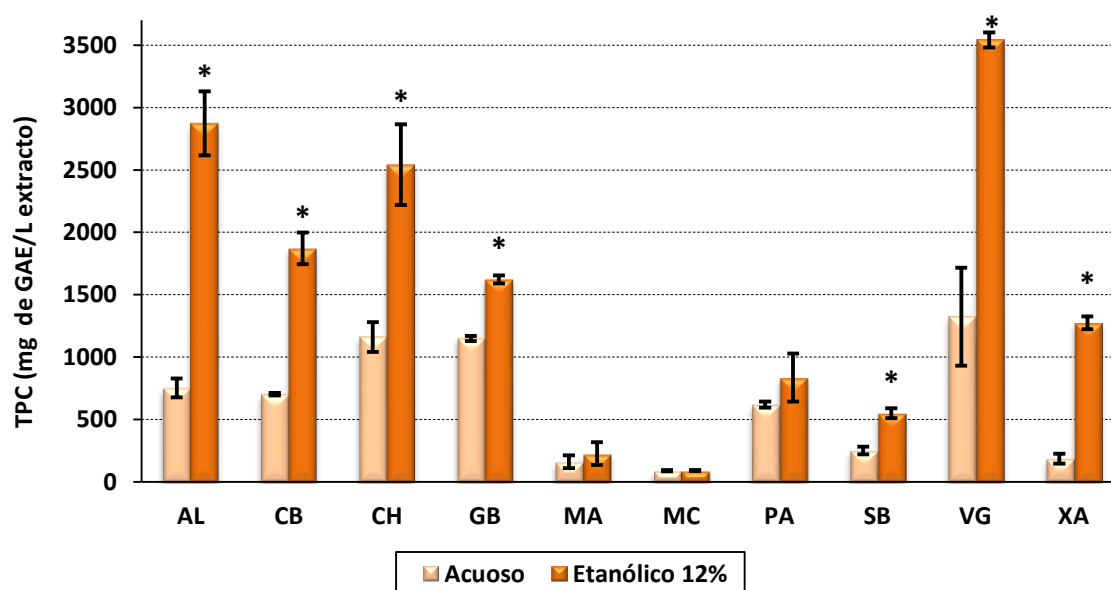


Figura 16. TPC de los extractos acuosos y etanólicos de las variedades de uva blanca de la añada 2008. (*) Diferencias significativas entre los dos tipos de extractos ($p \leq 0,05$).

En lo que se refiere a los extractos etanólicos, los mayores contenidos correspondieron a Viognier, Albariño y Chardonnay, situándose en valores más próximos a los esperables en un vino tinto (Arnous y col., 2001; Paixão y col., 2007; Rastija y col., 2009; Arcari y col., 2013; Hosu y col., 2014) que en un vino blanco. Por otro lado, variedades como Macabeo y Moscatel Alexandría mostraron valores inferiores al resto de variedades.

Como cabía esperar por el proceso de maceración, todas las variedades mostraron un mayor TPC respecto a los acuosos, excepto las variedades Macabeo, Moscatel Alexandría y Parellada. Sin embargo, al igual que ocurría en el ensayo del ABTS^{•+} no todos los extractos etanólicos mostraron el mismo incremento respecto a los acuosos. De esta manera, mientras que variedades como Garnacha blanca sólo experimentaron aumentos moderados, en el resto de variedades el proceso de maceración etanólica provocó una acusada extracción de compuestos fenólicos, destacando las variedades Albariño y Xarel.lo, cuyos incrementos fueron especialmente elevados.

- Comparación añadas 2007 y 2008.

La comparativa en los extractos de la añada 2007 y 2008 refleja que, al igual que sucedía con la capacidad antioxidante, ambas añadas presentaron grandes diferencias (Figura 17).

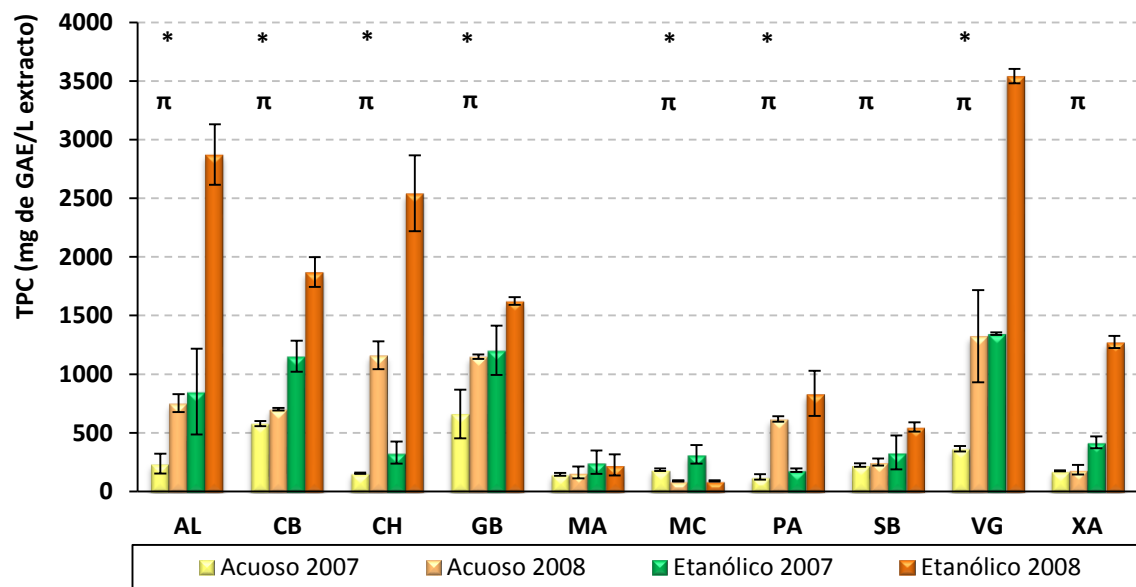


Figura 17. Comparativa del TPC entre añadas de los extractos acuosos de las uvas blancas.

(*) Diferencias significativas entre añadas para los extractos acuosos ($p \leq 0,05$).

(π) Diferencias significativas entre añadas para los extractos etanólicos ($p \leq 0,05$).

En este sentido, las variedades pertenecientes a la añada 2008 que mostraron los mayores incrementos en el contenido de compuestos fenólicos respecto a la añada 2007 resultaron ser Chardonnay, Viognier, Parellada y Albariño. Por el contrario, la variedad Macabeo resultó inferior en la añada 2008, mientras que las variedades Moscatel Alexandría, Xarel.lo y Sauvignon blanc mostraron mínimas diferencias o ninguna entre ambas añadas.

El contenido en compuestos fenólicos de los vinos blancos varía, en general, entre 100 y 500 mg de GAE/L (Flanzy, 2003; Sen y Tokalti, 2014; Tourtoglou y col., 2014). Sin embargo, conviene destacar la gran variabilidad existente en el TPC que puede presentar un vino, pudiendo superar los 500 mg de GAE/L e incluso los 1000 mg de GAE/L (Landrault y col., 2001; Paixão y col., 2007; Rastija y col., 2009; Arcari y col., 2014). De esta manera, el contenido en compuestos fenólicos de los extractos acuosos de la añada 2007 se correspondió, en general, con el habitual de vinos blancos. Sin embargo, en la añada 2008 muchos de los valores registrados en los extractos etanólicos fueron superiores a los encontrados en vinos blancos.

De acuerdo con numerosos estudios las uvas blancas y en especial sus pepitas y hollejos suponen una buena fuente de compuestos fenólicos con una marcada actividad antioxidante (Yang y col., 2009; Ruberto y col., 2007; Yemis y col., 2008; Breksa y col., 2010), dependiendo entre otros factores, de la variedad empleada. En este sentido, se han descrito valores TEAC y contenidos en compuestos fenólicos especialmente elevados para variedades como Riesling (Mitić y col., 2010; Lee y Rennaker, 2007) y Chardonnay (Landrault y col., 2001; Lee y Rennaker, 2007).

Respecto a la comparación con vinos monovarietales, los extractos acuosos de ambas añadas de las variedades Chardonnay y Sauvignon blanc y el extracto acuosos de la añada 2007 de Viognier fueron similares a los descritos en otros estudios (Landrault y col., 2001, Kallithraka y col., 2009; Fotakis y col., 2012; Cáceres-Mella y col., 2014), mientras que los extractos acuosos de las variedades Chenin blanc en ambas añadas y el de Viognier en la añada 2008 resultaron ser claramente superiores a vinos monovarietales de estas variedades (Landrault y col., 2001, De Beer y col., 2003, Fotakis y col., 2012).

Del análisis conjunto de los datos obtenidos en ambas añadas es posible extraer un patrón respecto a la actividad antioxidante y el TPC de las distintas variedades analizadas. En este sentido, las variedades Moscatel Alexandría y Macabeo dan lugar a mostos blancos con una baja actividad antioxidante con independencia del empleo o no de tiempos de maceración prolongados durante la obtención del mismo, mientras que Viognier, Garnacha blanca, Albariño y Chenin Blanc fueron las variedades que presentaron las mejores características.

3.1.2. Caracterización de extractos de variedades de uva tinta.

3.1.2.1. Medida de la actividad antioxidante.

- Añada 2007

El método ABTS^{•+} resulta un método muy apropiado para la determinación de la capacidad antioxidante en muestras de vinos tintos, ya que emplea una alta longitud de onda (734 nm) evitando, de esta manera, la interferencia generada por los antocianos (máximo de absorción a 520 nm). El valor TEAC de los extractos de las 16 variedades de uvas tintas analizadas se muestra en la Figura 18 y Tabla A.5 del Anexo.

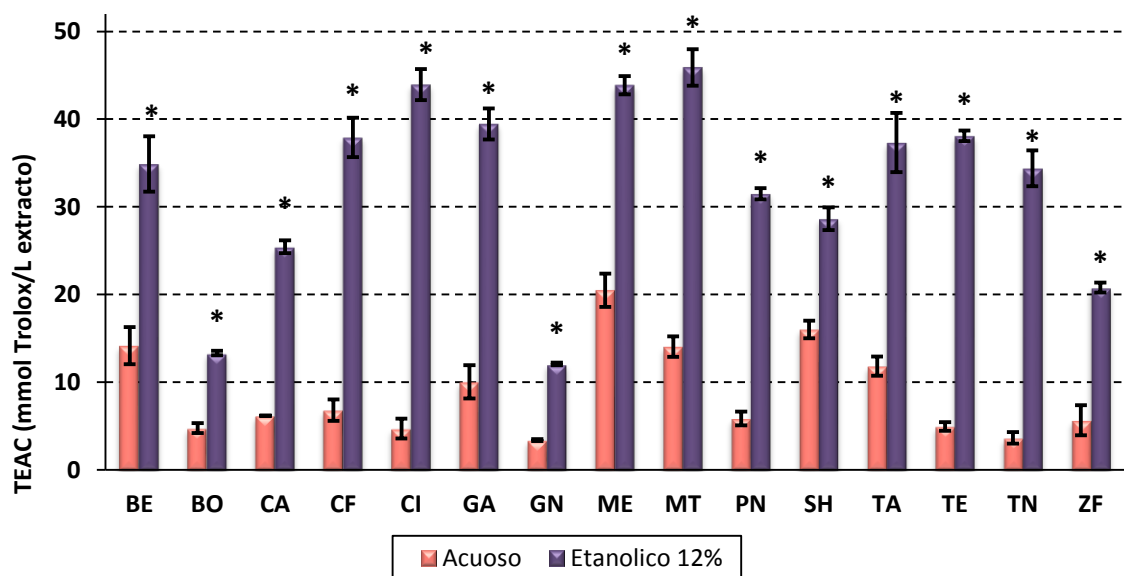


Figura 18. Valor TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de las variedades de uva tinta de la añada 2007. (*) Diferencias significativas entre los dos tipos de extractos ($p \leq 0,05$).

Respecto a los extractos acuosos, el valor TEAC varió entre $3,39 \pm 0,12$ mmol y $20,46 \pm 1,90$ mmol trolox/L. La variedad Mencía permitió la obtención del extracto acuoso más activo, seguido de la variedad Syrah y de las variedades Belsa y Merlot. En contraposición, las variedades que dieron lugar a los extractos con menor actividad fueron la Garnacha negra, seguida de Touriga nacional y de Cinsault, Bobal, Tempranillo y Zinfandel.

La vinificación en tintos conlleva una etapa fermentativa de maceración de los mostos con los hollejos y las pepitas. Así, la extracción etanólica mediante un proceso macerativo de las uvas tintas podría ser utilizada como referencia de las características esperables en un vino tinto monovarietal.

El método de extracción acelerada empleado en la obtención de los extractos etanólicos dio lugar a un aumento de la actividad antioxidante respecto a los extractos acuosos, mostrando en todas las variedades un incremento muy significativo del valor TEAC, situándose en valores que oscilaron entre $12,07 \pm 0,14$ mmol y $45,89 \pm 2,07$ mmol trolox/L. Respecto a los extractos etanólicos de la añada 2007 hay que destacar que no siguieron exactamente el mismo orden que los acuosos. De esta manera, aunque los extractos de Merlot y Mencía también fueron los más activos, junto con el de Cinsault, el extracto etanólico de Syrah no resultó ser de los más activos. El resto de los extractos poseían actividades comprendidas entre 20 mmol y 40 mmol trolox/L, excepto los de las variedades Garnacha negra y Bobal, que mostraron las menores actividades. Por tanto, no se produjeron los mismos incrementos en todos los extractos etanólicos en comparación con los acuosos. De esta forma, son destacables los incrementos en los extractos etanólicos de las variedades Touriga nacional (de $3,64 \pm 0,6$ mmol a $34,38 \pm 0,61$ mmol trolox/L), Tempranillo (de $4,94 \pm 0,49$ mmol a $38,09 \pm 0,61$ mmol trolox/L), Cinsault (de $4,7 \pm 1,14$ mmol a $43,93 \pm 1,77$ mmol trolox/L) y Cabernet Franc (de $6,80 \pm 1,23$ mmol a $37,91 \pm 2,25$ mmol trolox/L).

- Añada 2008

Los extractos acuosos de uvas tintas en la añada 2008 (Figura 19 y Tabla A.6 del Anexo), mostraron un valor TEAC comprendido entre $3,04 \pm 0,50$ mmol y $34,33 \pm 0,60$ mmol trolox/L, donde el extracto más activo correspondía a la variedad Merlot, seguido de las variedades Garró, Tannat y Belsa. En contraposición, los extractos obtenidos a partir de las variedades Cinsault, Cariñena y Zinfandel resultaron ser los menos activos.

En todas las variedades, la actividad antioxidante de los extractos etanólicos fue superior a la de sus extractos acuosos, mostrando un incremento significativo del valor TEAC. Al igual que ocurría en la añada 2007, los extractos etanólicos no siguieron, en general, el mismo patrón que los extractos acuosos, con valores TEAC en la añada 2008 que variaron entre $15,19 \pm 0,43$ mmol y $87,29 \pm 12,46$ mmol de trolox/L. El extracto etanólico de Tannat mostró la mayor actividad antioxidante, a pesar de que su extracto acuoso no presentaba una destacada actividad. Otro extracto etanólico muy activo correspondió a la variedad Merlot, con valores similares a Touriga Nacional. Por otro lado, las variedades con los extractos etanólicos menos activos resultaron ser Cinsault, Syrah y Zinfandel.

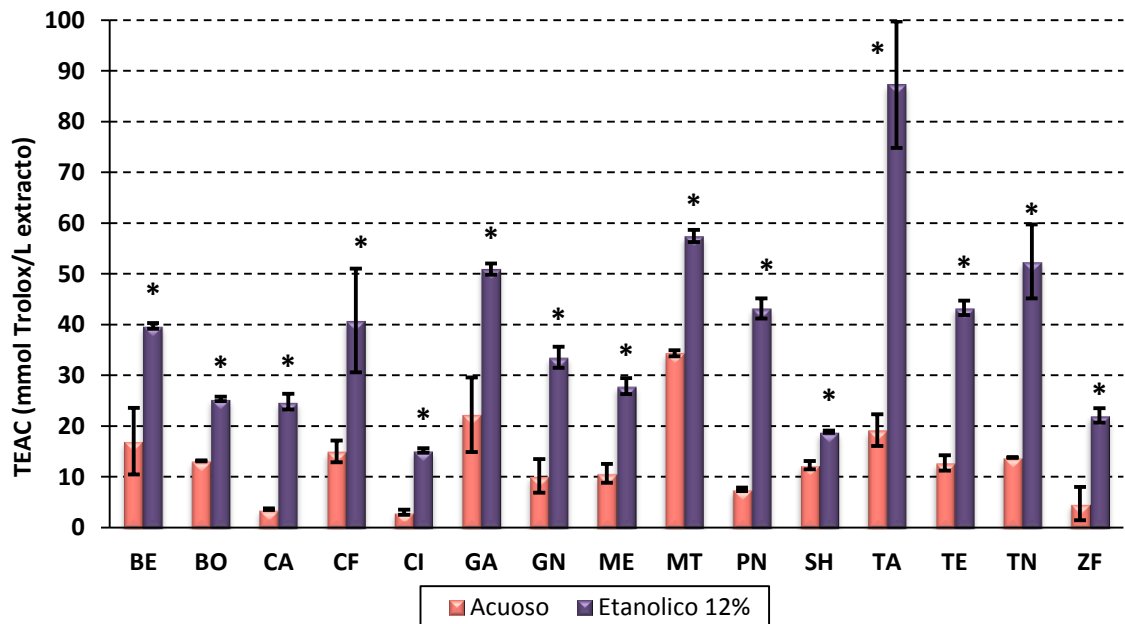


Figura 19. Valor TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de las variedades de uva tinta de la añada 2008. (*) Diferencias significativas entre los dos tipos de extractos ($p \leq 0,05$).

Como se puede observar en las Figuras 18 y 19 algunas variedades mostraron diferencias notables entre las dos repeticiones de cada extracto, aportando con ello una desviación considerable en los datos (por ejemplo, los extractos acuosos de la variedad Belsa). En este sentido, otros autores han puesto de manifiesto que vinos procedente de la misma región geográfica y pertenecientes a una misma añada pueden mostrar diferencias importantes entre ellos, destacando así una desatada variabilidad entre los datos (Di Majo y col., 2008; Lucena y col., 2010), e incluso, entre diferentes clones con idéntico material genético (Hogan y col., 2009), apoyando la existencia de una marcada variación intravarietal.

- Comparación de añadas 2007 y 2008

En general, existen notables diferencias entre los extractos acuosos y etanólicos de las uvas tintas entre ambas añadas (Figura 20). De esta manera, todas las variedades mostraron extractos más activos en la añada 2008 que en la añada 2007, excepto Belsa, Cariñena, Cinsault, Mencía, Syrah, y Zinfandel. En este sentido, es destacable el incremento en la añada 2008 del valor TEAC en los extractos acuosos de las variedades Merlot, Tempranillo, Bobal y Touriga nacional; mientras que los extractos etanólicos que presentaron un incremento destacable en la añada 2008 corresponden a Tannat (de $37,32 \pm 3,38$ mmol a $87,29 \pm 12,46$ mmol trolox/L) y la Garnacha negra (de $12,07 \pm 0,14$ mmol a $33,57 \pm 2,07$ mmol de trolox/L).

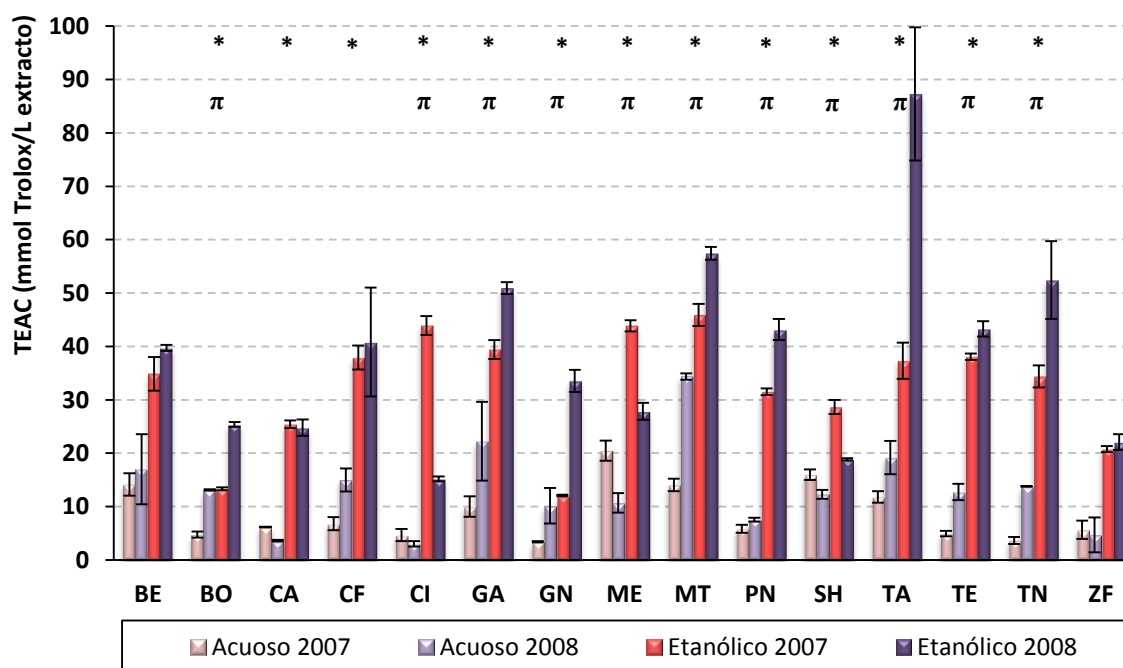


Figura 20. Comparativa del valor TEAC entre añadas de los extractos acuosos de las uvas tintas.

(*) Diferencias significativas entre añadas para los extractos acuosos ($p \leq 0,05$).

(π) Diferencias significativas entre añadas para los extractos etanólicos ($p \leq 0,05$).

Además, los extractos de uvas tintas con mayor actividad coincidieron, al menos en parte, con sus homólogos de la añada 2008. En este sentido, en la añada 2007 el extracto acuoso con mayor valor TEAC fue el de Mencía y posteriormente el de las variedades Syrah, Belsa y Merlot, mientras que en la añada 2008 resultaron ser el de Merlot, seguido de Garró, Tannat y Belsa. Por lo tanto, la variedad cuyo extracto acuoso presentó una alta actividad en ambas añadas fue Merlot, y en menor medida el de Belsa (Figura 19).

En general, para ambas añadas los extractos acuosos presentaron actividades antioxidantes intermedias entre los vinos blancos y vinos tintos, lo que concuerda con la ausencia de un proceso macerativo del mosto con los hollejos y pepitas (principales fuentes de compuestos antioxidantes) (Landrault y col., 2001; Fernández-Pachón y col., 2004; Paixão y col., 2007).

Asimismo, la tendencia de los extractos etanólicos de la añada 2007 fue, en general, diferente a la de los extractos etanólicos de la vendimia 2008 (Figura 20). Los extractos etanólicos de la variedad Merlot, Cinsault y Mencía mostraron las mayores actividades en la añada 2007, mientras que en la añada 2008 los extractos más activos correspondieron a las variedades Tannat y Merlot.

Por otro lado, aunque algunos de los extractos etanólicos de uvas tintas presentaron valores TEAC similares a los encontrados en la bibliografía (entre 9 mmol y 42,5 mmol trolox/L), una gran parte de ellos presentaron valores superiores (Landrault y col., 2001; De Beer y col., 2003; Anli y Vural, 2009; Li y col., 2009; Xu y col., 2014). Resulta importante señalar que la composición de un vino tinto puede verse afectada por diversos factores, tales como el origen geográfico (Daudt y Fogaça, 2013), las prácticas realizadas durante el cultivo de la vid (Melero y col., 2010) o las técnicas de vinificación empleadas, además del efecto de las condiciones climatológicas anteriormente comentado (Netzel y col., 2003; González-Neves y col., 2010; González-Neves y col., 2012; Toaldo y col., 2013).

De forma habitual los vinos tintos son estabilizados mediante clarificación y filtración. La clarificación de vinos con albúmina, bentonitas, gelatina o polivinilpirrolidona (PVPP) provoca un descenso en el contenido de compuestos fenólicos totales de los mismos, lo que se traduce en un descenso de la capacidad antioxidante; igualmente la etapa de filtración por membranas produce un ligero descenso en el contenido en compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los vinos (Burns y col., 2001; Villaño y col., 2006). Análogamente, otras actividades de estabilización de vinos como el empleo de la enzima lacasa, una enzima que cataliza la oxidación de varios compuestos aromáticos, provocan la reducción de la capacidad antioxidante de los vinos finales (Minussi y col., 2007).

Asimismo, diversos autores pusieron de manifiesto que el proceso de crianza y envejecimiento, al que suelen ser sometidos los vinos tintos, provoca cambios en la composición del vino (Arapitsas y col., 2014; Kilmister y col., 2014), lo que provoca una disminución en la actividad antioxidante de los mismos Larrauri y col., (1999).

Por lo tanto, las diferencias existentes entre los datos bibliográficos y los extractos etanólicos presentes en este estudio podrían ser debidos a que estos no han sufrido ninguno de los procesos de estabilización y crianza a los que son comúnmente sometidos los vinos tintos. Además, hay que considerar que durante la obtención de los extractos se produjo una reducción de tamaño de los hollejos y en menor medida de las pepitas, lo que podría producir un incremento en la capacidad de extracción de los compuestos fenólicos por parte del solvente durante el proceso de maceración acelerada, y por ende un incremento en la actividad antioxidante con respecto a un vino.

3.1.2.2. Determinación de compuestos fenólicos.

- Añada 2007

Con respecto a los extractos acuosos de las uvas tintas en la añada 2007 (Figura 21 y Tabla A.7 del Anexo), los valores de TPC variaron entre $362,84 \pm 30,65$ mg y $1690,66 \pm 71,00$ mg de GAE/L. Las variedades que presentaron mayores contenidos en compuestos fenólicos totales correspondieron a Mencía, Syrah y Tannat. Asimismo, los extractos acuosos de las variedades Garnacha negra y Cinsault, seguidos de Zinfandel y Touriga nacional resultaron ser los más pobres en compuestos fenólicos.

Por su parte, los valores de TPC de los extractos etanólicos oscilaron entre $1152,30 \pm 53,50$ mg y $4240,44 \pm 49,42$ mg de GAE/L. Para todas las variedades, los extractos etanólicos presentaron un mayor contenido que sus extractos acuosos, destacando los incrementos producidos en las variedades Cinsault, Cabernet franc, Touriga nacional y Tempranillo. Las variedades de mayor contenido de compuestos fenólicos en los extractos etanólicos resultaron ser Mencía seguido de Cinsault, Tannat y Merlot, mientras que los extractos etanólicos con contenidos de compuestos fenólicos menores resultaron ser los de Garnacha negra y Bobal.

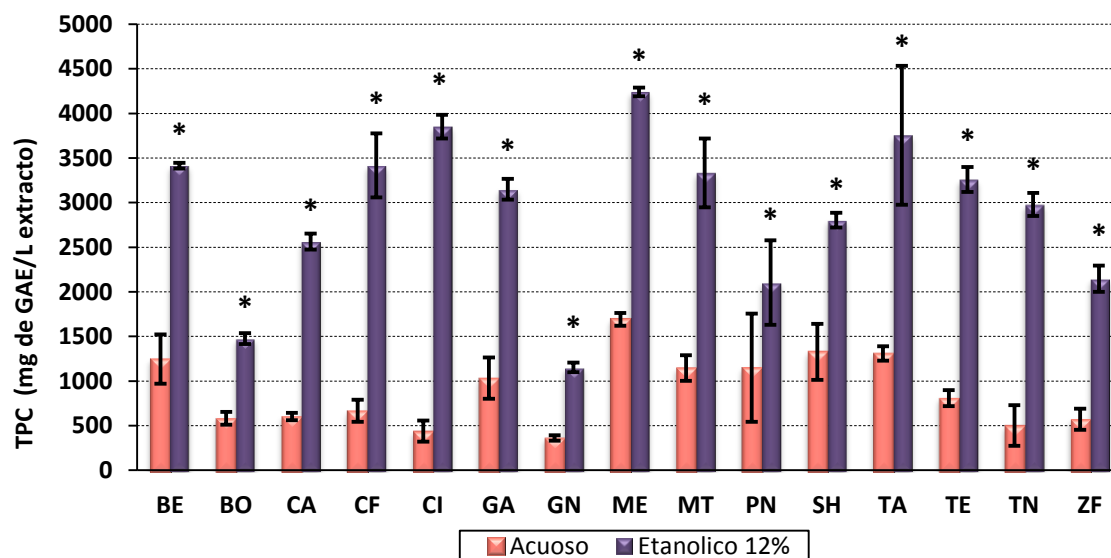


Figura 21. TPC de los extractos acuosos y etanólicos de las variedades de uva tinta de la añada 2007. (*) Diferencias significativas entre los dos tipos de extractos ($p \leq 0,05$).

- Añada 2008.

En la añada 2008 (Figura 22 y Tabla A.8 del Anexo) el contenido de los compuestos fenólicos en los extractos varió entre $503,73 \pm 170,045$ mg y $2812,19 \pm 77,93$ mg de

GAE/L. Así, los extractos acuosos con mayor TPC correspondieron a la variedad Merlot, seguidos de los correspondientes a Tannat y Garró, mientras que las variedades Cinsault, Cariñena y Zinfandel dieron lugar a extractos más pobres en compuestos fenólicos.

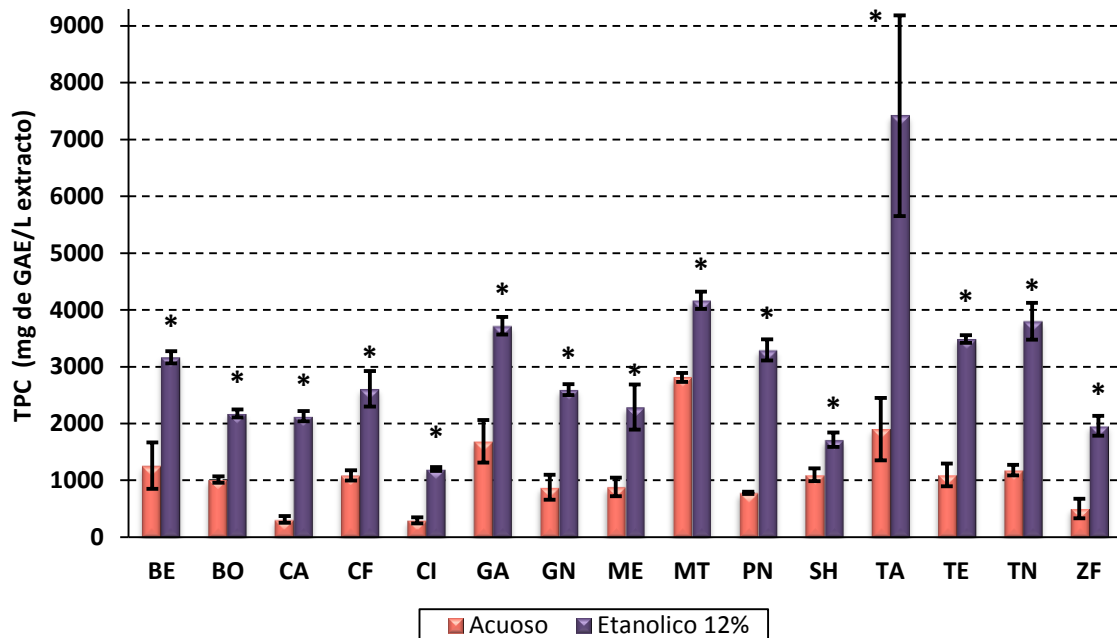


Figura 22. TPC de los extractos acuosos y etanólicos de las variedades de uva tinta de la añada 2008. (*) Diferencias significativas entre los dos tipos de extractos ($p \leq 0,05$).

Como cabe esperar por el proceso de maceración hidroalcohólica, los extractos etanólicos de todas las variedades tintas mostraron un incremento notable en el contenido de compuestos fenólicos, excepto para la variedad Syrah, cuyo incremento respecto al acuoso fue moderado. De este modo, se observó una gran variación para los valores de contenido de compuestos fenólicos entre las distintas variedades, mostrándose valores comprendidos entre $1715,25 \pm 127,58$ mg y $7420,94 \pm 1767,2$ mg de GAE/L de extracto. Los mayores contenidos en compuestos fenólicos correspondieron a la variedad Tannat, con un contenido claramente superior, seguido de Merlot. Por el contrario, los extractos etanólicos más pobres en compuestos fenólicos resultaron ser aquellos procedentes de las variedades Cinsault y Syrah.

- Comparación añadas 2007 y 2008.

Al establecer una comparativa en el contenido de compuestos fenólicos totales de la añada 2007 y 2008, puede observarse que existen notables diferencias entre añadas

(Figura 23). De esta manera, la mayoría de las variedades presentaron extractos con un contenido mayor en compuestos fenólicos en la añada 2008 que en la añada 2007, excepto en las variedades Belsa, Cariñena, Cinsault, Mencía, Syrah y Zinfandel. En este sentido, las variedades Merlot y Tannat destacaron en la añada 2008 por su gran incremento en el contenido de compuestos fenólicos en los extractos acuosos y etanólicos, respectivamente.

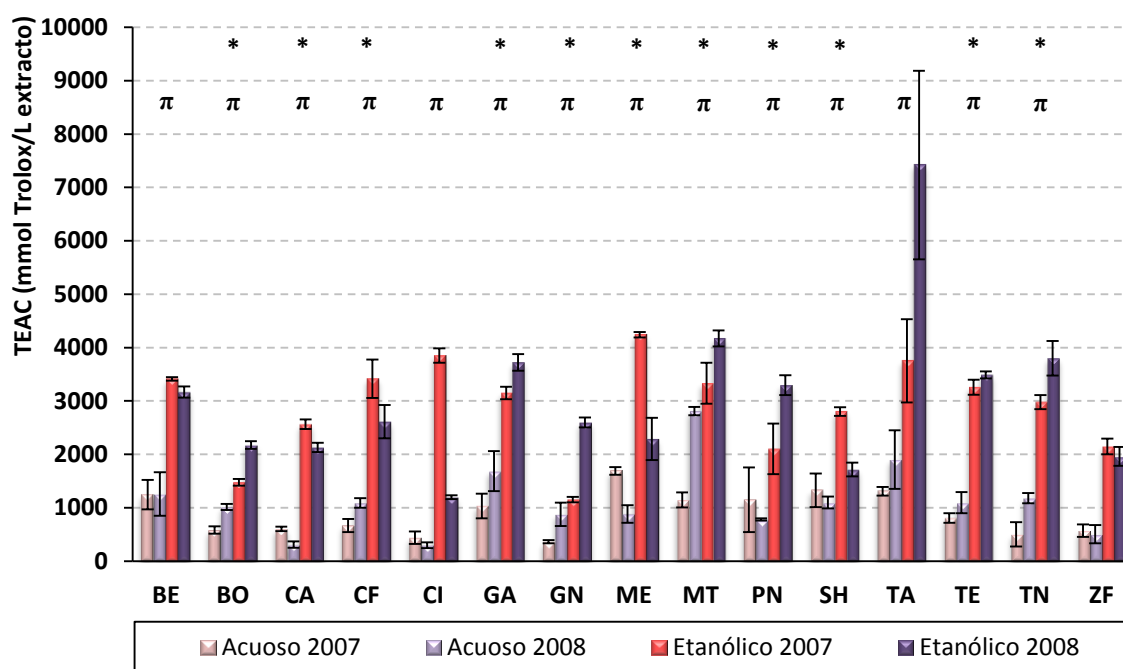


Figura 23. Comparativa del TPC entre añadas de los extractos acuosos de las uvas tintas.

(*) Diferencias significativas entre añadas para los extractos acuosos ($p \leq 0,05$).

(π) Diferencias significativas entre añadas para los extractos etanólicos ($p \leq 0,05$).

De manera similar a los valores de la actividad antioxidante, los extractos acuosos (en especial la añada 2007) presentaron contenidos de compuestos fenólicos intermedios entre los habitualmente encontrados en vinos blancos y tintos (Landrault y col., 2001, Villaño y col., 2004; Hosu y col., 2014). Hay que tener en cuenta que durante su obtención, el contacto entre las pepitas y los hollejos (fuente principal de compuestos fenólicos) con el mosto sólo se produjo durante la obtención y centrifugación de los extractos. Por lo tanto, la transferencia de compuestos fenólicos al extracto fue, en general, muy parcial, lo que se reflejó en su contenido fenólico así como en su actividad antioxidante.

El TPC fue, en general para ambas añadas similar al encontrado en vinos tintos, a excepción de algunos extractos en los que se obtuvieron mayores contenidos (Landrault

y col., 2001 Fernández-Pachón y col., 2004; Paixão y col., 2007; Lucena y col., 2010; Šeruga y col., 2011; Hosu y col., 2014). Por otra parte, los resultados del contenido de compuestos fenólicos totales aportados por diversos autores en vinos monovarietales muestran gran variabilidad entre ellos, demostrando la existencia de dicha variación intravarietal (Kondrashov y col., 2009; Vrček y col., 2011; Rebelo y col., 2013), coincidiendo algunos de ellos con los valores obtenidos en los extractos etanólicos de Syrah de la añada 2007 y 2008 (Di Majo y col., 2008, Gris y col., 2011; Šegura y col., 2011; Varoni y col., 2013), algunos de Merlot (Di Majo y col., 2008; Lucena y col., 2010, Gris y col., 2011), Zinfandel (Woraratphoka y col., 2007) y Tannat en la añada 2007 (Lucena y col., 2010). Varios autores destacan a Tannat como una variedad con un elevado contenido de compuestos fenólicos, aportando cantidades elevadas de *trans*-resveratrol (González-Neves y col., 2004; Rockenbach y col., 2008). Por otro lado, el TPC de las variedades Touriga nacional, Cariñena, Tempranillo, Garnacha negra y Merlot fueron más altos que los encontrados en la bibliografía (Landrault y col., 2001; De Beer y col., 2003; Li y col., 2009; Anli y Vural, 2009).

A pesar de que el contenido de compuestos fenólicos en algunas variedades fue similar al esperado para vinos tintos, en otras mostraron valores superiores. Por un lado, hay que considerar que el proceso de extracción realizado puede incrementar la extracción de compuestos fenólicos al provocar una reducción de tamaño en la uva (Bucić-Kojić y col., 2009). Por otro lado, Makris y col., (2007) indican que las pepitas suponen la mayor fuente de compuestos fenólicos, incluso con extractantes hidroalcohólicos de bajo porcentaje etanólico. Aunque el procedimiento de extracción empleado en el presente estudio mantenía íntegras las pepitas en la mayoría de las muestras, no podría descartarse la posibilidad de roturas durante el procesado de algunos extractos. Así, la reducción de tamaño de las pepitas supondría un incremento considerable en la transferencia de compuestos fenólicos, por ser las pepitas la parte de la uva con mayor contenido en estos compuestos. Asimismo, la presencia de etanol disgrega la capa lipídica que protege a las pepitas, incrementando la extractabilidad (Ivanova y col., 2009). De este modo, es lógico pensar que una reducción de tamaño en las pepitas supondría un efecto extractivo más pronunciado en los extractos etanólicos que en los acuosos.

Como ya se ha comentado anteriormente, el contenido de compuestos fenólicos presentes en la uva puede sufrir variaciones entre añadas en función de numerosas variables. En este sentido, en este estudio se partió siempre de uva sanas recogida en las mismas cepas y sometidas a las mismas práctica agrícolas, por lo que la causa más probable de variación del contenido en compuestos fenólicos y actividad antioxidante entre añadas estaría relacionada con la existencia de notables diferencias meteorológicas entre la climatología de los años 2007 y 2008. Según los datos facilitados por el Instituto Nacional de Meteorología (INM), las condiciones climatológicas de los meses estivales del año 2007 y 2008 fueron marcadamente diferentes (Figura 24).

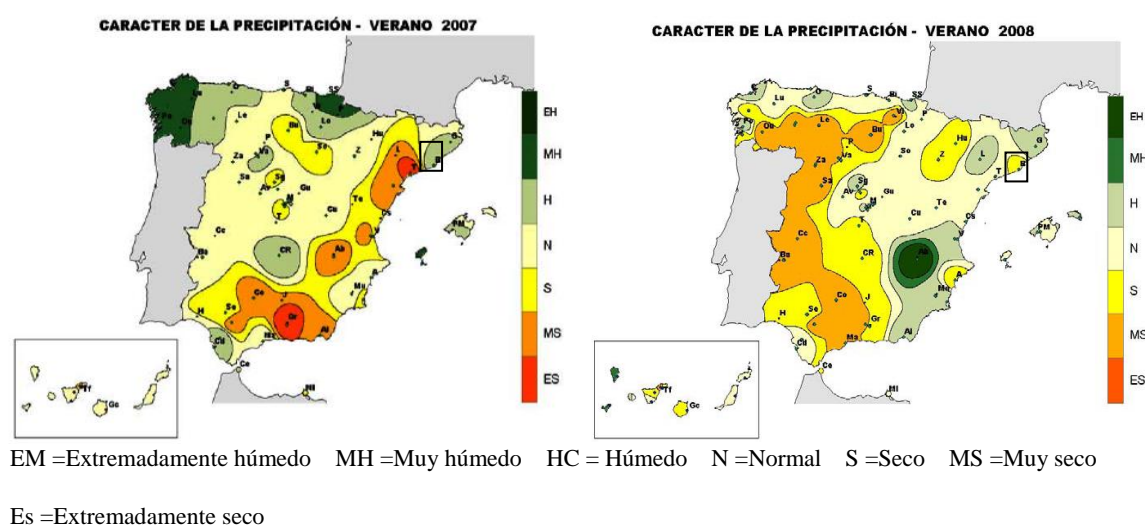


Figura 24. Precipitaciones registradas durante el verano del año 2007 y el verano 2008.

Así, se produjo una pluviometría superior a la media durante los tres meses de verano de 2007, suponiendo por tanto, un verano de características de húmedas a muy húmedas en la zona costera catalana. Por el contrario, en el año 2008 el mes de junio tuvo un carácter húmedo, pero seco en julio y agosto, lo que podría tener una repercusión directa en el contenido en humedad de las uvas y por tanto en el porcentaje de los demás constituyentes.

En relación a la climatología, existen diversos factores que sugieren que un clima más cálido supone un mayor contenido en compuestos fenólicos de las uvas. Así, la exposición de las vides a un clima seco durante la maduración del fruto supondría una menor irrigación y menores precipitaciones, así como una mayor irradiación solar, factores que se han correlacionado con un incremento de compuestos fenólicos en el fruto (González-Neves y col., 2012; Méndez-Costabel y col., 2014). Así, los

incrementos del TPC y actividad antioxidante para las uvas de este estudio en la añada 2008 respecto a la añada 2007, sería consecuencia de las diferencias climatológicas entre ambas añadas, siendo acentuado este efecto por el carácter seco en la añada 2008.

Además, hay que considerar que no todas la uvas presentan la misma capacidad adaptativa a climas cálidos, donde las menos adaptadas generan un contenido de compuestos fenólicos menor (Villaño y col., 2006). Este hecho podría explicar que el patrón de incremento del TPC en la añada 2008 no sea homogéneo entre las distintas variedades de este estudio. Sin embargo, para poder confirmar dicha hipótesis, sería necesario un análisis más exhaustivo que permitiese indicar la adaptación de cada variedad al clima.

3.1.3. Correlación entre la actividad antioxidante y la medida de TPC.

Al representar la actividad antioxidante de los extractos acuosos y etanólicos de las variedades de uva blanca y uva tinta respecto a su contenido en compuestos fenólicos tanto para la añada 2007 como para la añada 2008 se observa una excelente correlación entre ambas variables, tanto para los extractos de uvas blancas ($R = 0,989$) como para los de uvas tintas ($R = 0,979$). De esta manera, en la Figura 25 se muestra la correlación existente entre el valor TEAC y el TPC de todos los extractos analizados, donde se observa la alta correlación existente entre ambas variables ($p = 0,000$).

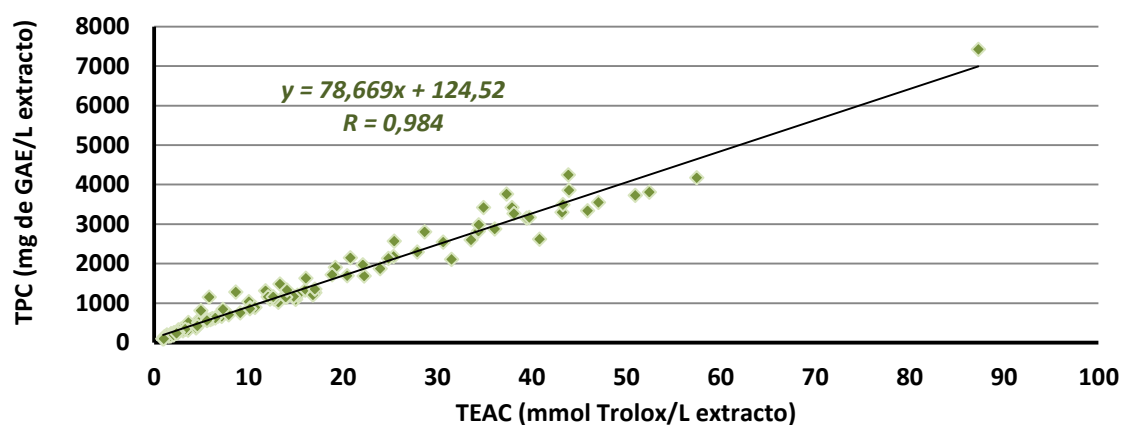


Figura 25. Correlación de los valores TEAC y TPC de los extractos acuosos y extractos etanólicos en las añadas 2007 y 2008 de las uvas blancas y tintas conjuntas.

A pesar de existir una correlación excelente entre ambas variables, puede observarse cómo algunos extractos muestran una ligera desviación respecto al modelo de regresión lineal. En este sentido, hay que tener en cuenta que no todos los compuestos fenólicos

presentes en las uvas muestran la misma actividad antioxidante, ni se encuentran presentes en la misma proporción, de tal manera que tanto el aumento en el contenido de compuestos fenólicos como la variación de su perfil pueden suponer variaciones de la actividad antioxidante de las uvas o de sus extractos (Di Majo y col., 2008; Iacopini y col., 2008; Mudnic y col., 2010). Asimismo, durante la maceración del mosto con el hollejo y las pepitas se puede producir la extracción de compuestos no fenólicos con actividad antioxidante como la vitamina C (De Beer y col., 2003; Dani y col., 2007). De esta manera, el incremento producido en la actividad antioxidante de variedades como Touriga nacional, Tempranillo y Pinot noir podría ser debido a diferencias en la composición fenólica de los extractos etanólicos respecto a los acuosos o a la extracción de otro tipo de compuestos antioxidantes. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis sería necesario llevar a cabo un exhaustivo análisis de la composición de dichos extractos.

De este modo, en los extractos obtenidos a partir de uvas blancas y de tintas, se puede establecer que tanto para los extractos acuosos como para los etanólicos los compuestos fenólicos se muestran como los principales responsables de la actividad antioxidante de los mismos.

Numerosos autores también han descrito una correlación significativa entre la medida de la actividad antioxidante y el contenido en compuestos fenólicos totales, con independencia del método empleado en dichas determinaciones (Alonso-Borbalán y col., 2003; Cho y col., 2004; Paixão y col., 2007; Kondrashov y col., 2009; Vrček y col., 2011).

Una vez analizados los resultados obtenidos se puede afirmar que las variedades de uva Viognier, Garnacha blanca, Albariño y Chenin Blanc parecen ser las más adecuadas para la formulación de bebidas funcionales dotadas de una alta actividad antioxidante y TPC a partir de la extracción directa de sus mostos. En este sentido, el empleo de tiempos prolongados de maceración con hollejos y pepitas con o sin presencia de etanol, daría lugar a un aumento importante de dichos atributos. Sin embargo, en un estudio posterior sería interesante averiguar el impacto sensorial que estas maceraciones tendrían en el vino final.

Por otra parte, Tannat y Merlot, junto con Garró, serían las variedades tintas que presentarían unas características más interesantes a la hora de formular bebidas con una alta capacidad antioxidante y alto contenido en compuestos fenólicos.

Sin embargo, tal y como se refleja en la Figura relativa al plan de trabajo de la presente memoria, una vez llevados a cabo los estudios sobre la actividad *in vitro* de los extractos obtenidos, el siguiente paso a dar consistiría en la caracterización y medida de la biodisponibilidad de los extractos más interesantes.

3.1.4. Caracterización de los extractos.

Vistas las conclusiones obtenidas en el apartado anterior se seleccionaron los extractos etanólicos de las variedades Viognier, Tannat, Merlot y Garró como los más adecuadas para formular bebidas con un posible efecto beneficioso sobre la salud. La añada utilizada fue la del 2008.

El análisis del perfil fenólico de los extractos seleccionados se llevó a cabo mediante un análisis de HPLC-RP-DAD con la intención de determinar la composición fenólica individual de cada uno de ellos (Tabla 4).

En cuanto al extracto de uva blanca, el grupo fenólico principal fueron los flavanoles, destacando la catequina y epicatequina, seguido de los flavonoles, donde cabría destacar un contenido notable de la quercetina-3-O-glucósido. De hecho, mientras que en el caso del grupo de las catequinas los niveles fueron, en general, inferiores a los encontrados en las uvas tintas, el contenido en el derivado glucosilado de la quercetina fue mayor.

De un modo general, el contenido en ácidos fenólicos y flavonoles del extracto de Viognier se correspondió con el determinado previamente para vinos monovarietales de esta variedad, a excepción del ácido caftárico y la quercetina-3-O-glucurónido, que resultaron notablemente inferiores al descrito para estos vinos (Landrault y col., 2001; Castillo-Muñoz y col., 2010), y del ácido sirínico, que resultó superior al hallado en vinos blancos y más próximo a los vinos tintos (Figueiredo-González y col., 2014; Xiang y col., 2014). Coincidiendo con estos autores, el derivado glucosilado de la quercetina fue el flavonol mayoritario.

Resulta importante destacar que el contenido de todos los flavanoles resultó notablemente superior al encontrado tanto en vinos de Viognier como en otros vinos blancos (Landrault y col., 2001; Arcari y col., 2013; Cáceres-Mella y col., 2014),

asemejándose al contenido de los vinos tintos (Sen y Tokalti, 2014). Este enriquecimiento respecto a los vinos blancos sería debido, por tanto, a la transferencia de flavanoles desde los hollejos y más concretamente desde las pepitas en el proceso de maceración acelerada.

Tabla 4. Composición fenólica de los extractos etanólicos pertenecientes a la añada 2008 (mg de compuesto/L de extracto).

			TANNAT	GARRÓ	MERLOT	VIOGNIER
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	5,75 ± 0,106	4,17 ± 0,11	8,78 ± 0,06	2,56 ± 0,37
		Ácido Protocatéquico	Nd	0,048 ± 0,002	0,035 ± 0,004	0,284 ± 0,003
		Monogaloil glucósido	0,63 ± 0,06	2,31 ± 0,13	2,65 ± 0,30	0,803 ± 0,03
		Ácido 4-hidroxibenzoico	Coeluye	Nd	Coeluye	Nd
		Ácido Vainílico	Nd	3,01 ± 0,07	Nd	Nd
		Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	36,89 ± 2,42	Nd	Nd	Nd
		Ácido Siríntrico	Coeluye	6,89 ± 0,24	0,97 ± 0,10	6,68 ± 0,36
		Etil Galato	Nd	0,35 ± 0,04	0,51 ± 0,10	Nd
		Aldehído Protocatéquico	2,59 ± 0,25	0,45 ± 0,02	Trazas	0,46 ± 0,08
		Ácido Elágico	Trazas	Nd	Nd	Nd
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	93,32 ± 0,60	4,97 ± 0,18	2,46 ± 0,31	2,30 ± 0,16
		Ácido p-Cumárico	1,30 ± 0,07	1,00 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,021 ± 0,005
		Ácido Ferúlico	1,74 ± 0,12	Nd	Nd	Nd
	ESTILBENOS	trans-Piceido	Coeluye	Coeluye	Nd	Nd
		trans-Resveratrol	0,43 ± 0,04	Nd	Nd	Nd
FLAVONIODES	FLAVANOLES	Catequina	103,64 ± 16,04	58,09 ± 1,50	256,77 ± 8,23	40,28 ± 0,20
		Epicatequina	97,35 ± 5,55	56,02 ± 0,60	344,74 ± 19,91	56,13 ± 2,05
		Epicatequina Galato	22,52 ± 3,35	Nd	25,02 ± 1,71	6,11 ± 0,27
		Dímero B1	104,80 ± 2,96	34,45 ± 0,88	49,82 ± 3,37	36,06 ± 1,01
		Dímero B2	165,01 ± 9,40	63,39 ± 0,75	63,66 ± 3,76	19,83 ± 0,61
	FLAVONÓLES	Hiperósido	4,04 ± 0,11	3,65 ± 0,06	5,35 ± 0,62	10,26 ± 0,75
		Rutina	2,18 ± 0,22	1,69 ± 0,28	3,63 ± 0,78	2,58 ± 0,96
		Quercetina-3-O-glucuronido	31,95 ± 0,13	20,39 ± 0,21	28,02 ± 3,78	13,03 ± 0,06
		Quercetina-3-O-glucósido	24,59 ± 0,20	19,16 ± 0,20	38,15 ± 1,38	45,47 ± 0,49
	ANTOCIANOS	Delfinidina-3-O-glucósido	82,21 ± 1,06	11,50 ± 0,43	173,81 ± 3,44	-
		Cianidina-3-O-glucósido	15,78 ± 0,07	3,31 ± 0,04	63,26 ± 1,15	-
		Malvidina-3-O-glucósido	708,26 ± 3,44	195,23 ± 1,21	263,68 ± 2,43	-
		Derivados de cianidina	104,85 ± 1,62	33,62 ± 0,44	117,22 ± 1,95	-
		Derivados de petunidina	49,40 ± 0,74	8,71 ± 0,15	15,59 ± 0,47	-
		Antocianos no identificados	497,44 ± 6,95	76,34 ± 2,01	202,62 ± 4,45	-

*Nd (no detectado)

El perfil fenólico general de los tres extractos obtenidos a partir de variedades de uva tinta resultó similar, caracterizándose por los antocianos como el grupo fenólico principal, donde destaca la malvidina-3-O-glucósido como el compuesto mayoritario del extracto, seguido de los flavanoles (catequina y epicatequina, principalmente). De este modo, el perfil de antocianos siguió las características propias de los vinos tintos, donde la malvidina-3-O-glucósido es el antociano mayoritario y en donde la cianidina-3-O-glucósido se encuentra en cantidades significativamente inferiores a los otros dos antocianos identificados (González-Neves y col., 2007). Además, en el extracto de Tannat cabría destacar también el contenido de los dímeros de procianidinas B₁ y B₂. Asimismo, se observaron cantidades notables de los flavonoles quercetina-3-O-glucurónido y de la quercetina-3-O-glucósido.

El contenido de los diferentes compuestos fenólicos observado en vinos monovarietales que se muestra en la bibliografía presenta una gran variabilidad en los datos, debido por tanto a la variabilidad intervarietal e intravarietal que se ha comentado anteriormente. En este sentido, los extractos etanólicos de Tannat (Boido y col., 2011; González-Neves y col., 2012; Favre y col., 2014) y de Merlot (Granato y col., 2011; Gris y col., 2011; Sen y Tokalti, 2014), mostraron un contenido de antocianos y flavanoles superior al determinado para vinos monovarietales de estas variedades. Para el extracto de Garró no fue posible establecer una comparación con vinos monovarietales, pues no se encontraron datos en la bibliografía acerca de dicha variedad. Aunque la cantidad de flavanoles y antocianos fue inferior a la determinada para Tannat y Merlot, dicho contenido se encuentra en los valores observados para otras variedades tintas (Boido y col., 2011; Martelo-Vidal y Vázquez, 2014; Sen y Tokalti, 2014; Rebelo y col., 2014).

Para los flavonoles, mientras que el extracto de Tannat mostró contenidos superiores a los de los vinos monovarietales (Boido y col., 2011; González-Neves y col., 2012; Favre y col., 2014), tanto para el extracto de Merlot como para el de Garró fueron similar a vinos monovarietales de Merlot (Sen y Tokalti, 2014)

Por otro lado, para los tres extractos se encontraron contenidos variados de diversos ácidos fenólicos, tanto hidroxibenzoicos como hidroxicinámicos. En este sentido, cabría destacar los contenidos de gálico, sirínico y ácido caftárico. En el extracto de Tannat, el contenido del ácido gálico y del ácido p-cumárico coincide con el hallado comúnmente para vinos de esta variedad (Boido y col., 2011; Favre y col., 2014),

mientras que en general, para el extracto de Merlot estos valores resultaron inferiores a los mostrados en vinos monovarietales (Landrault y col., 2001; Panceri y col., 2013), al igual que el extracto de Garró respecto a vinos tintos (Sen y Tokalti, 2014; Favre y col., 2014; Figueiredo-González y col., 2014).

Además, coincidiendo con Favre y col. (2014), se encontraron pequeñas cantidades de *trans*-resveratrol y de ácido elágico, así como *trans*-piceído.

3.1.5. Biodisponibilidad.

Resulta importante evaluar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos a través de modelos que simulen tanto el proceso de digestión como la absorción intestinal. Estos ensayos se justifican en el hecho de que, durante el proceso de la digestión, las matrices vínicas pueden sufrir cambios diversos tanto en su contenido de compuestos fenólicos como en la actividad antioxidante que presentan (Martínez-Ortega y col., 2001; Liang y col., 2012; Fernández y Labra, 2013). Del mismo modo, el proceso de absorción intestinal, tras la etapa de la digestión, resulta particular según la matriz y composición fenólica general (Serra y col., 2010), lo que hace necesario evaluar la absorción potencial de los compuestos fenólicos.

De este modo, una vez estudiado el potencial funcional de los extractos de uva de las variedades blancas y tintas, y determinado cuáles presentaron el mayor contenido en compuestos fenólicos y la mayor actividad antioxidante, se procedió a analizar la biodisponibilidad de dichos extractos. Inicialmente, los extractos seleccionados se sometieron a un modelo de digestión *in vitro*, para posteriormente, estudiar la absorción intestinal de los compuestos fenólicos presentes en los digeridos a través de un modelo celular Caco-2. Asimismo, se determinó la actividad antioxidante de los extractos durante las distintas etapas del proceso de la digestión así como en la absorción intestinal.

3.1.5.1. Biodisponibilidad de extractos etanólicos de uva blanca.

Como se acaba de comentar se partió de los extractos etanólicos de la añada 2008 de la variedad Viognier. Para llevar a cabo dicho estudio, se sometió al extracto a un modelo de digestión *in vitro*, evaluándose posteriormente la absorción intestinal del digerido obtenido previamente.

3.1.5.1.1. Digestión in vitro.

Con el objeto de conocer el efecto del proceso de la digestión sobre el extracto etanólico de Viognier, se determinó su composición fenólica antes del proceso digestivo y tras dicho proceso, así como su actividad antioxidante.

- Composición fenólica.

Tal y como puede observarse en la Tabla 5, la digestión produjo un descenso en la mayoría de los compuestos fenólicos identificados inicialmente en el extracto. Dicho descenso fue especialmente pronunciado para la catequina y el dímero B₁, que no pudieron ser identificados tras el proceso de la digestión, y para la epicatequina, que mostró pérdidas equivalentes al 72 %. Otro compuesto para el que se detectó un descenso importante fue el ácido gálico. Con respecto a los flavonoles, los cambios observados resultaron más leves, mostrando las mayores pérdidas para el hiperósido (37 %).

Tabla 5. Composición fenólica del extracto etanólico de Viognier durante el proceso digestivo (mg compuesto por L de extracto).

			VIOGNIER	
			Inicial	Intestinal
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	2,56 ± 0,37 ^a	0,08 ± 0,007 ^b
		Ácido Protocatéquico	0,284 ± 0,003 ^a	0,07 ± 0,00 ^b
		Monogaloil glucósido	0,803 ± 0,03 ^a	0,322 ± 0,04 ^b
		Ácido Siríngico	6,68 ± 0,36 ^a	4,84 ± 0,93 ^b
		Aldehído protocatéquico	0,46 ± 0,08 ^a	0,44 ± 0,06 ^a
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	2,30 ± 0,16 ^b	3,11 ± 0,06 ^a
		Ácido p-Cumárico	0,021 ± 0,005	Nd
FLAVONIODES	FLAVANÓLES	Catequina	40,28 ± 0,20	Nd
		Epicatequina	56,13 ± 2,05 ^a	15,74 ± 2,48 ^b
		Galato de epicatequina	6,11 ± 0,27 ^b	8,05 ± 0,40 ^a
		Dímero B1	36,06 ± 1,01	Nd
		Dímero B2	19,83 ± 0,61 ^a	25,52 ± 1,033 ^a
	FLAVONÓLES	Hiperósido	10,26 ± 0,75 ^a	6,42 ± 0,37 ^b
		Rutina	2,58 ± 0,96 ^a	2,36 ± 0,26 ^a
		Quercetina-3-O-glucuronido	13,03 ± 0,06 ^a	8,79 ± 0,53 ^b
		Quercetina-3-O-glucósido	45,47 ± 0,49 ^a	36,08 ± 0,17 ^b

^{a,b}Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Sin embargo, hay que destacar que tras el proceso de la digestión se observaron pequeños incrementos en algunos compuestos como el ácido caftárico, el galato de epicatequina y el dímero B₂.

En este sentido, los estudios realizados por otros autores sobre el efecto del proceso digestivo en la composición fenólica de distintos extractos o alimentos muestran una amplia diversidad de resultados.

Algunos autores han detectado interacciones entre monómeros de flavanoles y las proteínas salivares (Obrique-Sier y col., 2011) así como entre estas proteínas y las proantocianidinas (Sun y col., 2013). Del mismo modo, otros autores muestran interacciones entre diversos tipos de compuestos fenólicos y las enzimas digestivas (pepsina y pancreatina), provocando una reducción de los mismos (Siracusa y col., 2011; Helal y col., 2014). Así, Laurent y col., (2007) observaron una disminución acusada, tras el proceso digestivo, tanto de los monómeros de flavanoles (catequina y epicatequina) como de los dímeros, indicando una interacción de estos compuestos con las proteínas digestivas. Mientras que otros autores (Neilson y col., 2007) indicaron que durante la digestión podrían suceder transformaciones en los compuestos fenólicos, tales como la formación de dímeros de flavanoles a partir de monómeros que serían los responsables en las modificaciones de los extractos tras la digestión. Además, debido al pH de la fase intestinal se ha descrito que durante dicha etapa se pueden producir pérdidas importantes de compuestos fenólicos (Zhu y col., 2002; McDougall y col., 2005).

De este modo, los datos obtenidos en este trabajo para los flavanoles presentes en el extracto etanólico de Viognier podrían explicarse mediante ambos fenómenos. Por una parte, se produce un descenso muy importante tanto de catequina como de epicatequina y dímero B₁ que podría deberse a la interacción de estos compuestos con las enzimas digestivas pero por otra parte hay un aumento de dímero B₂ que se explicaría por posibles reacciones entre los compuestos durante el proceso de la digestión.

- Actividad Antioxidante.

Se evaluó la actividad antioxidante tanto del extracto original como del digerido (Figura 26). Para ello se empleó el método del DPPH, ya que no presenta interferencias con los distintos componentes de las secreciones digestivas, siendo por tanto, un método

adecuado para la determinación de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos en extractos y alimentos a través del proceso digestivo (Huang y col., 2014).

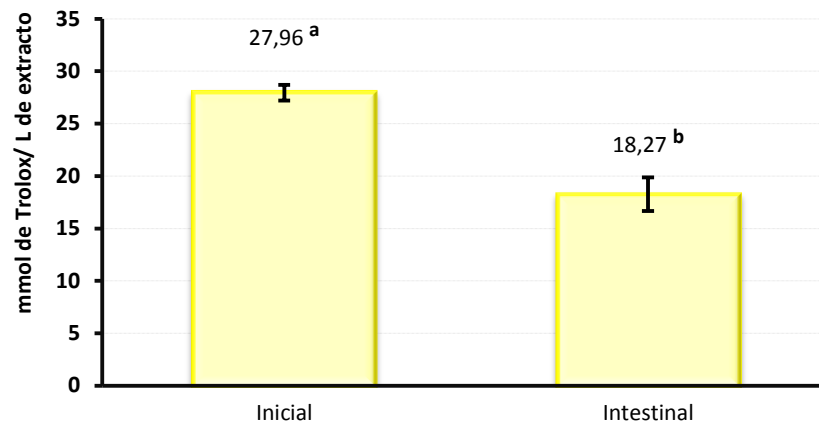


Figura 26. Valor TEAC del extracto etanólico de Viognier durante el proceso digestivo.

^{a,b}Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Los resultados indicaron un descenso en la actividad antioxidante del extracto tras la digestión, que supuso una pérdida equivalente al 35 % del valor inicial. No obstante, a pesar de las pérdidas registradas tras el proceso digestivo, dicho extracto mantuvo una actividad antioxidante elevada (18,27 mmol de trolox/ L de extracto).

El efecto de la digestión sobre la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos ha sido estudiado previamente por otros autores, con resultados muy dispares. De este modo, algunos estudios ponen de manifiesto que el efecto de la digestión provoca un incremento en la actividad antioxidante, el cual se asocia a un aumento en el contenido de compuestos fenólicos (Noguer y col., 2008; Wooton-Beard y col., 2011). Mientras que, otros autores indican pérdidas de actividad antioxidante asociadas a cambios en la composición, principalmente a un descenso de flavonoides durante el proceso digestivo (Chen y col., 2013; Huang y col., 2014). En este sentido, Tagliazuchi y col., (2010) encontró una buena correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en cada una de las etapas de la digestión.

De este modo, los procesos descritos anteriormente podrían explicar las pérdidas de actividad antioxidante observada en el extracto de Viognier tras el proceso de la digestión.

3.1.5.1.2. Absorción intestinal.

Tras el proceso de la digestión se evaluó la absorción intestinal del extracto digerido. De este modo, se estudió el efecto de la absorción intestinal sobre la actividad antioxidante del extracto digerido, analizando para ello dicha actividad tanto en la fracción no absorbida (apical) como en la biodisponible (basolateral). Así, mediante el método del DPPH se determinó la actividad antioxidante del extracto digerido capaz de ser absorbida a través de la barrera intestinal (Figura 27).

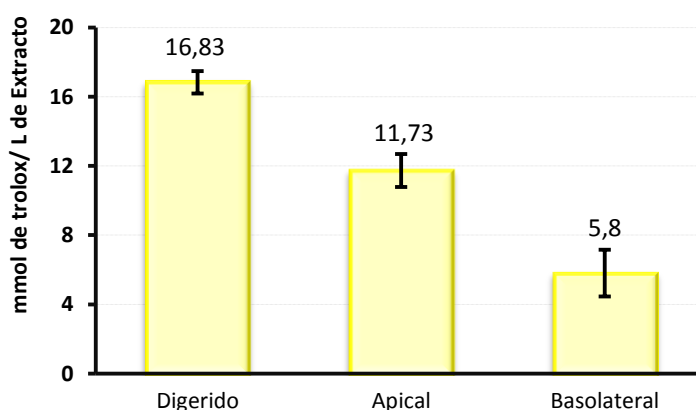


Figura 27. Valor TEAC en la fracción biodisponible tras seis horas de absorción intestinal.

Dicha actividad fue de aproximadamente un 36 % de la que presentaba el digerido de Viognier, detectándose así un valor equivalente a 5,8 mmol de trolox/ L de extracto en el compartimento basolateral.

Así, podemos concluir que, a pesar de que el proceso de digestión supone una importante pérdida de la actividad antioxidante del extracto, hay una cierta cantidad de compuestos fenólicos que son biodisponibles y que van a aportar la actividad antioxidante detectada en la fracción biodisponible, siendo por tanto adecuado para la elaboración de vinos o bebidas funcionales capaces de incorporar antioxidantes biodisponibles.

3.1.5.2. Biodisponibilidad de extractos etanólicos de uva tinta.

Asimismo, se llevó a cabo el estudio del proceso de digestión aplicado a los extractos etanólicos de las tres variedades de uva tinta seleccionadas.

3.1.5.2.1. Digestión in vitro.

- Composición fenólica.

La influencia del proceso digestivo sobre el perfil fenólico de los tres extractos analizados afectó a todos los grupos de compuestos estudiados (Tabla 6). Estos mostraron, en general, el mismo patrón en los tres extractos estudiados.

En este sentido, el efecto de la digestión resultó crítico para los antocianos, aunque también fue pronunciado en los flavanoles, con independencia de la variedad de uva de procedencia. Con respecto a los flavonoles, los cambios resultaron en general menos acusados, encontrándose cantidades elevadas de la quercetina-3-O-glucurónido y quercetina-3-O-glucósido tras la digestión. Durante el proceso digestivo los ácidos fenólicos también experimentaron cambios importantes en su composición. En este sentido, se observaron pérdidas acusadas para el ácido gálico en los tres extractos estudiados, junto con una disminución acusada del ácido caftárico en el extracto de Tannat. Por el contrario, algunos de estos compuestos como el ácido vainílico y el siríngico mostraron incrementos importantes.

Como ya se ha comentado con anterioridad, los resultados obtenidos por otros autores sobre el efecto de la digestión sobre los compuestos fenólicos en alimentos o extractos muestran una gran disparidad. En este sentido, Martínez-Ortega y col., (2001) compararon la digestión de compuestos fenólicos puros en un medio vínico simulado con los presentes en vinos. Así, durante la fase gástrica, los ácidos fenólicos parecen no sufrir cambios significativos, y algunos de ellos son estables incluso en la fase intestinal, a excepción del ácido gálico que desciende notablemente en la fase intestinal como consecuencia del pH. No obstante, McDougall y col., (2005) y Noguer y col., (2008) indican que la descomposición de antocianos durante la fase intestinal debido al pH básico, da origen a la formación de diversos ácido fenólicos. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en este estudio, ya que los ácidos fenólicos resultaron en general estables a la digestión, mientras que el contenido de ácido gálico descendió drásticamente. Además, la extensa degradación de los antocianos observada explicaría los importantes aumentos detectados para el ácido vainílico y siríngico tras la etapa intestinal.

Tabla 6. Composición fenólica de los extractos etanólicos de Tannat, Merlot y Garró (2008) a través del proceso de la digestión, (mg compuesto por L de extracto).

		TANNAT		GARRÓ		MERLOT	
		Inicial	Intestinal	Inicial	Intestinal	Inicial	Intestinal
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS						
	Ácido Gálico	5,75 ± 0,11 ^a	0,48 ± 0,07 ^b	4,17 ± 0,11 ^a	0,54 ± 0,01 ^b	8,78 ± 0,06 ^a	0,53 ± 0,02 ^b
	Ácido Protocatéquico	Nd	0,21 ± 0,00	0,048 ± 0,002 ^b	0,072 ± 0,003 ^a	0,035 ± 0,004 ^b	0,198 ± 0,004 ^a
	Monogaloil glucósido	0,63 ± 0,06 ^a	0,62 ± 0,02 ^a	2,31 ± 0,13 ^a	2,27 ± 0,16 ^a	2,65 ± 0,30 ^a	2,46 ± 0,05 ^a
	Ácido 4-hidroxibenzoico	Coeluye	Coeluye	Nd	1,89 ± 0,02	Coeluye	Coeluye
	Ácido Vainílico	Nd ^b	45,54 ± 0,61 ^a	3,01 ± 0,07 ^b	14,69 ± 0,23 ^a	Nd	22,41 ± 0,62
	Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	36,89 ± 2,42 ^b	45,56 ± 1,49 ^a	Nd	Nd	Nd	Nd
	Ácido Sirínico	Coeluye	92,32 ± 4,44	6,89 ± 0,24 ^b	44,12 ± 0,24 ^a	0,97 ± 0,10 ^b	28,86 ± 1,48 ^a
	Galato de etilo	Nd	Nd	0,35 ± 0,04	Nd	0,51 ± 0,10	Trazas
	Ácido Elágico	Trazas	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	Aldehído Protocatéquico	2,59 ± 0,25 ^a	2,26 ± 0,10 ^a	0,45 ± 0,02 ^b	0,60 ± 0,01 ^a	Trazas	Nd
CINÁMICOS	Ácido Caftárico	93,32 ± 0,60 ^a	34,39 ± 0,49 ^b	4,97 ± 0,18 ^a	5,36 ± 0,29 ^a	2,46 ± 0,31 ^a	2,98 ± 0,27 ^a
	Ácido p-Cumárico	1,30 ± 0,07 ^a	1,50 ± 0,24 ^a	1,00 ± 0,02 ^b	2,28 ± 0,07 ^a	0,37 ± 0,02 ^b	0,85 ± 0,03 ^a
	Ácido Ferúlico	1,74 ± 0,12	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
ESTILBENOS	trans-Piceido	Coeluye	8,01 ± 0,27	Coeluye	0,36 ± 0,02	Nd	Nd
	trans-Resveratrol	0,43 ± 0,04	Trazas	Nd	Nd	Nd	Nd
FLAVONOIDES	FLAVANOLES						
	Catequina	103,64 ± 16	Nd	58,09 ± 1,50 ^a	19,89 ± 0,40 ^b	256,77 ± 8,2 ^a	26,73 ± 2,10 ^b
	Epicatequina	97,35 ± 5,55	Trazas	56,02 ± 0,60	Trazas	344,74 ± 20 ^a	21,07 ± 3,35 ^b
	Galato de epicatequina	22,52 ± 3,35	Nd	Nd	Nd	25,02 ± 1,71	Trazas
	Dímero B1	104,80 ± 2,9	Nd	34,45 ± 0,88	Nd	49,82 ± 3,37 ^a	7,11 ± 0,69 ^b
	Dímero B2	165,01 ± 9,4	Nd	63,39 ± 0,75 ^a	18,82 ± 1,46 ^b	63,66 ± 3,76	Nd
	FLAVONOLES						
	Hiperósido	4,04 ± 0,11 ^a	0,39 ± 0,14 ^a	3,65 ± 0,06 ^a	0,92 ± 0,05 ^b	5,35 ± 0,62 ^a	2,08 ± 0,20 ^b
	Rutina	2,18 ± 0,22 ^a	0,85 ± 0,06 ^b	1,69 ± 0,28 ^a	0,84 ± 0,03 ^b	3,63 ± 0,78 ^a	1,58 ± 0,30 ^b
	Quercetina 3-O-glucuronido	31,95 ± 0,13 ^a	6,97 ± 0,5 ^b	20,39 ± 0,21 ^a	7,09 ± 0,07 ^b	28,02 ± 3,78 ^a	11,80 ± 0,31 ^b
	Quercetina 3-O-glucósido	24,59 ± 0,20 ^a	11,55 ± 0,13 ^b	19,16 ± 0,20 ^a	10,83 ± 0,08 ^b	38,15 ± 1,38 ^a	23,91 ± 1,16 ^b
	ANTOCIANOS						
	Delfinidina-3-O-glucósido	82,21 ± 1,06	Nd	11,50 ± 0,43	Nd	173,81 ± 3,44	Nd
	Cianidina-3-O-glucósido	15,78 ± 0,07	Nd	3,31 ± 0,04	Trazas	63,26 ± 1,15 ^a	0,56 ± 0,03 ^b
	Malvidina-3-O-glucósido	708,26 ± 3,44 ^a	1,13 ± 0,09 ^b	195,23 ± 1,21 ^a	0,37 ± 0,01 ^b	263,68 ± 2,43 ^a	0,85 ± 0,16 ^b
	Derivados de cianidina	104,85 ± 1,6	Trazas	33,62 ± 0,44	Nd	117,22 ± 1,95 ^a	0,65 ± 0,09 ^b
	Derivados de petunidina	49,40 ± 0,74	Nd	8,71 ± 0,15	Nd	15,59 ± 0,47	Nd
	Antocianos no identificados	497,44 ± 6,95 ^a	0,88 ± 0,04 ^b	76,34 ± 2,01 ^a	0,33 ± 0,03 ^b	202,62 ± 4,45 ^a	1,36 ± 0,11 ^b

^{a,b}. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

El descenso observado en el caso de los flavanoles también está en consonancia con lo descrito en la bibliografía, donde se indican pérdidas de entre el 40 % y el 90 % (Martínez-Ortega, 2001; Laurent y col., 2007). En este sentido, la interacción de proteínas digestivas con monómeros de flavanoles como la catequina y la epicatequina, así como con dímeros, contribuiría al descenso de estos compuestos tras el proceso digestivo (Laurent y col., 2005; Serra y col., 2010). Además, es importante considerar que durante la digestión se podrían suceder transformaciones en los compuestos dando lugar a una menor identificación de compuestos por HPLC (Green y col., 2007; Ryan y Prescott, 2010; Chen y col., 2013), tales como la formación de aductos (McDougall y col., 2005) o la formación de dímeros de flavanoles a partir de monómeros (Neilson y col., 2007). En este sentido, tras la digestión se puede observar aumentos en ciertos compuestos no identificados.

Con respecto a los flavonoles, aunque de manera menos acusada, la digestión resultó en general en un descenso para todos ellos, tal y como han observado otros autores que puede suceder en matrices vínicas (Martínez-Ortega y col., 2001).

Considerando todos los aspectos anteriormente expuestos, los resultados obtenidos en este estudio se corresponden además con los obtenidos por Stalmach y col., (2012), quienes llevaron a cabo la simulación de la digestión sobre un mosto de uva tinta. Estos autores encontraron que tras el proceso de la digestión se produce una pérdida especialmente acusada para los flavanoles y antocianos, mientras que los ácidos fenólicos resultaron más resistentes.

- Actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de los extractos de uva tinta estudiados se analizó tras el proceso de digestión, mostrándose los resultados en la Figura 28. Así, se observaron pérdidas de actividad totales equivalentes al 15 % (Tannat), 42 % (Garró) y 26 % (Merlot) con respecto a la actividad inicial de los extractos. En este sentido, hay que destacar que la pérdida de actividad antioxidante tras el proceso de digestión es menor para la variedad Tannat, lo que se podría relacionar con su mayor contenido en compuestos fenólicos tras la digestión, hecho evidenciado en el apartado anterior.

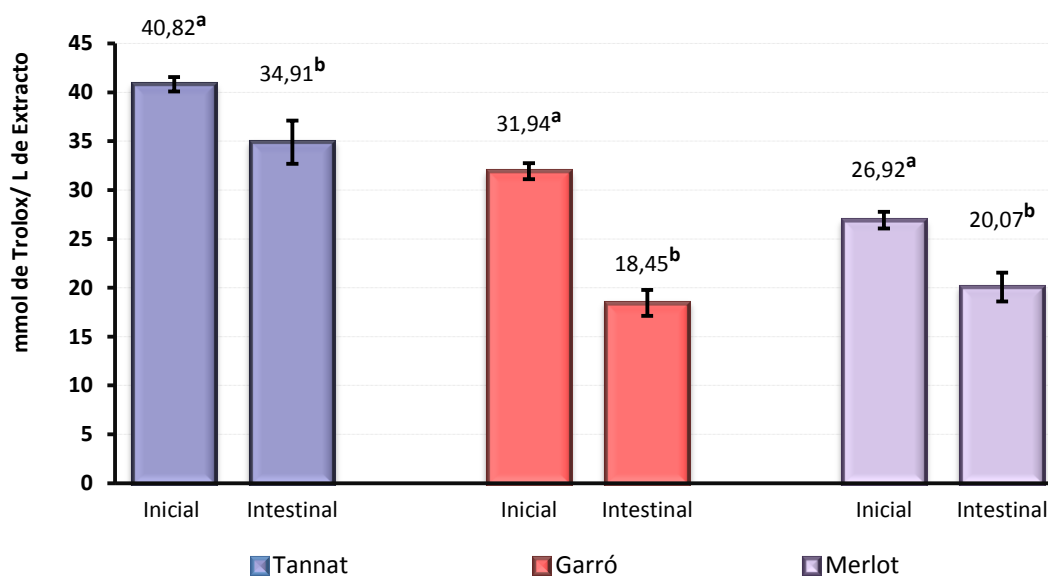


Figura 28. Valor TEAC de los extractos durante el proceso digestivo.

^{a,b} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

3.1.5.2.2. Absorción intestinal.

Los resultados obtenidos para la actividad antioxidante de la fracción apical y basolateral tras la absorción intestinal de los extractos digeridos se muestran en la Figura 29. Como se puede observar, todos los extractos mostraron un ratio de absorción muy similar, próxima al 36 % de la actividad antioxidante de sus correspondientes digeridos. Así, el proceso de absorción intestinal puso de manifiesto que la variedad que aportaba una mayor actividad a la fracción biodisponible resultó ser Tannat, con un valor TEAC de 12,34 mmol de trolox/L de extracto.

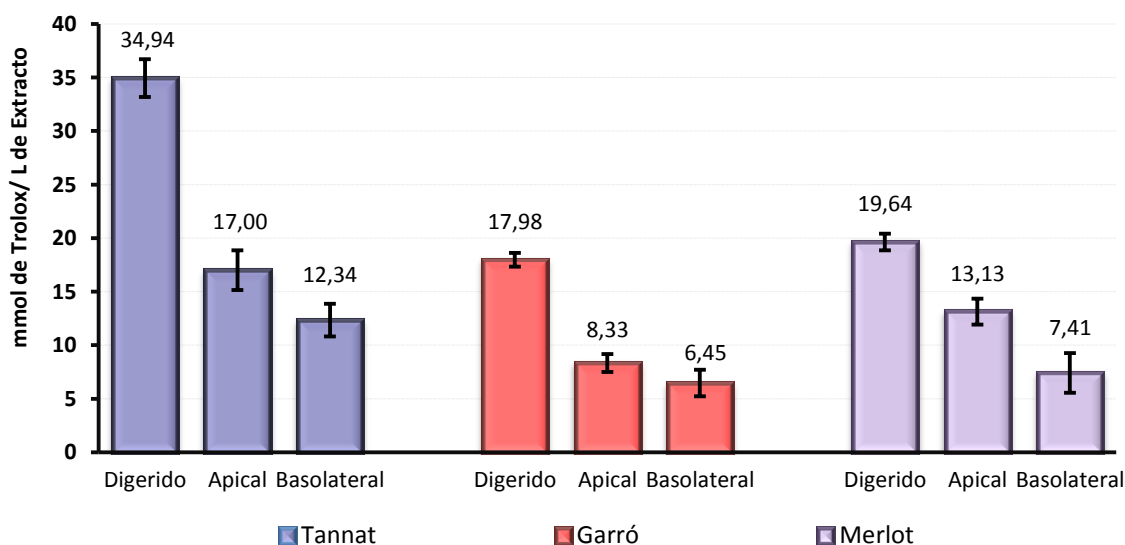


Figura 29. Valor TEAC en la fracción biodisponible tras seis horas de absorción intestinal.

Una vez estudiada la biodisponibilidad de los diferentes extractos, se decidió analizar la composición fenólica de la fracción biodisponible del extracto etanólico de Tannat, ya que dicho extracto es quien aporta una mayor actividad antioxidante (Tabla 7).

Tabla 7. Absorción intestinal de los compuestos fenólicos presentes en la fase intestinal (mg de compuesto / L de extracto).

		ETANÓLICO DE TANNAT 2008	
		Digerido	Basolateral
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	0,48 ± 0,07
		Ácido Protocatéquico	0,21 ± 0,00
		Monogaloil glucósido	0,62 ± 0,02
		Ácido 4-hidroxibenzoico	Coeluye
		Ácido Vainílico	45,54 ± 0,61
		Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	45,56 ± 1,49
		Ácido Sirínico	92,32 ± 4,44
		Galato de etilo	Nd
		Ácido Elágico	Nd
		Aldehído Protocatéquico	2,26 ± 0,10
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	34,39 ± 0,49
		Ácido p-Cumárico	1,50 ± 0,24
		Ácido Ferúlico	Nd
FLAVONIODES	ESTILBENOS	trans-Piceido	8,01 ± 0,27
		trans-Resveratrol	Trazas
	FLAVANOLAS	Catequina	Nd
		Epicatequina	Trazas
		Galato de epicatequina	Nd
		Dímero B1	Nd
		Dímero B2	Nd
	FLAVONOLAS	Hiperósido	0,39 ± 0,14
		Rutina	0,85 ± 0,06
		Quercetina-3-O-glucuronido	6,97 ± 0,5
		Quercetina-3-O-glucósido	11,55 ± 0,13
	ANTOCIANOS	Delfinidina-3-O-glucósido	Nd
		Cianidina-3-O-glucósido	Nd
		Malvidina-3-O-glucósido	1,13 ± 0,09
		Derivados de cianidina	Trazas
		Derivados de petunidina	Nd
		Antocianos no identificados	0,88 ± 0,04b
			Nd

Para ello se analizó tanto la composición fenólica del digerido como de la fracción basolateral de dicho extracto. Tal y como puede observarse, la fracción biodisponible se caracterizó principalmente por la presencia de ácidos fenólicos, con un contenido importante en ácido sirínico y caftárico, junto con cantidades menores aunque destacables de quercetina-3-O-glucósido y en menor medida de trans-piceido. Además, en esta fracción se detectaron pequeñas cantidades de ácido p-cumárico y quercetina-3-O-glucurónido.

Con todo ello, podemos indicar que la actividad antioxidante detectada anteriormente en la fracción biodisponible se podría atribuir a estos compuestos, principalmente a los ácidos sirínico y caftárico, junto con la quercetina-3-O-glucósido.

En este sentido, Konishi y col., (2003) mostraron la absorción de diversos ácidos fenólicos, entre ellos los ácidos sirínico y p-cumárico. Asimismo, Stalmach y col., (2012) detectaron varios ácidos fenólicos en plasma tras el consumo de un mosto de uva tinta.

Además, Henry-Vitrac y col. (2006) demostraron que el piceido presentaba una absorción efectiva a través del transportador dependiente de glucosa SGLT1, el cual se encuentra a su vez involucrado en el transporte de flavonoides glucosilados, como la quercetina-3-O-glucósido (Gee y col., 1998). Este fenómeno explicaría la presencia de estos compuestos en la fracción biodisponible analizada en este estudio.

Con todo ello, podemos concluir que los extractos etanólicos estudiados presentan una actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos importante, derivado principalmente a su elevado contenido en flavanoles y antocianos, destacando el extracto etanólico de Tannat. Sin embargo, durante el proceso digestivo, todos los extractos presentaron un descenso importante tanto en su contenido en flavanoles como en antocianos, mostrando por ello pérdidas en su capacidad antioxidante. En este sentido, el extracto de Tannat se caracterizó por ser el que presentó un menor descenso en dicha actividad durante el proceso digestivo. Del mismo modo, los ensayos de absorción intestinal indicaron que la actividad antioxidante de la fracción biodisponible estaría comprendida entre 5,8 y 12,34 mmol de trolox/L de extracto. Para el extracto de Tannat, cuya fracción biodisponible presentaba la mayor capacidad antioxidante, dicha actividad estaría proporcionada principalmente por ácidos fenólicos (sirínico y vainíllico) junto con piceido y quercetina-3-O-glucósido.

Con todo esto, podemos concluir que los tres extractos de uva tinta analizados, y en menor medida los de Viognier, resultarían adecuados para la formulación de vinos o bebidas funcionales capaces de aportar antioxidantes biodisponibles, donde el extracto obtenido a partir de Tannat sería, en este caso, el más adecuado para dicho propósito.

3.2. Raspón.

3.2.1. Extracción PLE de raspón.

La extracción de compuestos fenólicos antioxidantes a partir de raspón se llevó a cabo mediante el empleo de líquidos presurizados, debido a las numerosas ventajas que presenta esta técnica respecto a las técnicas convencionales de extracción sólido-líquido.

Se utilizó un diseño experimental central compuesto rotatorio 2^3 , formado por 19 experimentos, tal y como se detalla en el apartado de materiales y métodos. El empleo de dicho diseño permitió el estudio en profundidad del efecto de tres factores distintos (proporción de etanol:agua, temperatura y tiempo; Et, T y t) en las variables de respuesta utilizadas (rendimiento, actividad antioxidante, contenido total de compuestos fenólicos y composición fenólica según el grado de polimerización). En la Tabla 8 se muestran las distintas condiciones de extracción utilizadas en cada uno de los experimentos realizados. Del mismo modo, en la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las variables respuesta analizada.

Tabla 8. Matriz del diseño experimental del raspón.

Exp	Et (%)	T (°C)	t (min)
1	20	56	3
2	80	56	3
3	20	104	3
4	80	104	3
5	20	56	9
6	80	56	9
7	20	104	9
8	80	104	9
9	0	80	6
10	100	80	6
11	50	40	6
12	50	120	6
13	50	80	1
14	50	80	11
15	50	80	6
16	50	80	6
17	50	80	6
18	50	80	6
19	50	80	6

Tabla 9. Valores experimentales obtenidos para las diferentes variables respuesta.

Exp	Rendimiento	TPC	ABTS	DPPH	Mono- y oligómeros	Polímeros metanol	Polímeros agua	Polímeros totales
	(g extracto/ 100 g raspón)	(mg GAE/ g extracto)	(mmol trolox/ g extracto)		(mg catequina/ g extracto)			
1	21,49	118,11	2,06	0,65	19,53	30,02	15,36	45,38
2	9,37	114,06	1,89	0,55	52,72	14,55	8,09	22,64
3	27,54	164,02	2,89	0,97	24,48	42,64	23,38	66,02
4	23,34	145,88	2,50	0,81	31,51	32,10	22,87	54,96
5	21,02	148,67	2,63	0,86	27,16	41,97	22,14	64,11
6	10,31	113,22	1,94	0,56	69,97	21,26	11,58	32,85
7	28,49	178,67	3,33	1,19	26,59	44,58	25,50	70,08
8	14,75	135,27	2,42	0,72	52,64	19,65	10,59	30,24
9	24,91	147,83	2,54	0,87	17,81	21,68	14,50	36,18
10	12,36	87,41	1,39	0,29	98,73	4,06	6,91	10,97
11	18,78	129,41	2,24	0,77	30,67	34,53	17,54	52,07
12	30,62	186,62	3,43	1,22	26,51	49,78	32,24	82,02
13	21,16	147,83	2,60	0,88	26,26	38,42	24,90	63,33
14	24,72	172,67	2,96	1,06	27,73	44,51	29,91	74,42
15	22,82	167,60	2,98	1,00	47,45	22,05	12,78	34,83
16	24,98	171,83	3,00	1,05	45,43	21,62	12,70	34,32
17	24,28	167,92	2,94	1,03	45,67	21,30	12,57	33,87
18	24,11	169,74	2,95	0,98	45,34	21,82	12,91	34,73
19	23,97	160,25	2,77	1,01	46,65	21,48	12,25	33,73

Aunque existen referencias bibliográficas respecto a la extracción de compuestos fenólicos utilizando, entre otros disolventes, metanol y acetona (González-Centeno y col., 2012; Teixeira y col., 2014), en este estudio se planteó el uso de disolventes GRAS (Generally Recognized As Safe), como el etanol o el agua, con el fin de utilizar unas condiciones de extracción lo más respetuosas posibles con el medio ambiente. Asimismo, numerosos estudios avalan el empleo de mezclas de agua:etanol para la extracción de compuestos fenólicos a partir de subproductos de la vinificación (Makris y col., 2007; Domínguez-Perlés y col., 2014). De esta manera, en el presente estudio se utilizaron mezclas de etanol:agua desde el 0 % al 100 % como solvente de extracción.

Respecto a la temperatura de extracción, el intervalo de temperaturas seleccionado se situó entre 40 °C y 120 °C. Aunque, en general, el uso de temperaturas elevadas produce un aumento de la solubilidad de los compuestos de la matriz (Silva y col., 2007), en este estudio no se emplearon temperaturas superiores a los 120 °C con el fin de evitar la degradación de compuestos fenólicos (Arapitsas y Turner, 2008).

Por último, los tiempos de extracción seleccionados variaron entre 1 y 11 minutos, ya que el empleo de tiempos de extracción mayores favorece la degradación de compuestos sin mejorar su extractabilidad (Li y col., 2011; Wijngaard y col., 2012).

3.2.1.1. Rendimiento, TPC, valor TEAC

Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento muy similar para las siguientes variables respuesta: rendimiento, TPC, valor TEAC (DPPH) y valor TEAC (ABTS). De esta manera, el análisis estadístico posterior de los datos obtenidos indicó que, en todos los casos, los valores experimentales se ajustaban al modelo propuesto, explicando más del 90% de los mismos. Asimismo, los tres factores estudiados resultaron significativos para cada una de las variables respuesta, afectando de manera similar a dichas variables. A modo de ejemplo se muestran los resultados obtenidos para el TPC en la Figura 30.

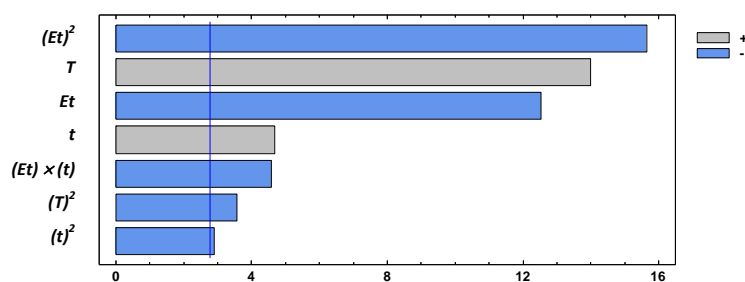


Figura 30a

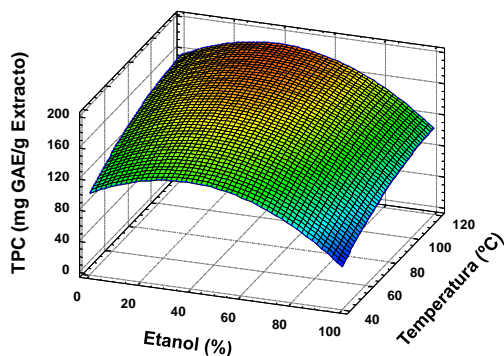


Figura 30b

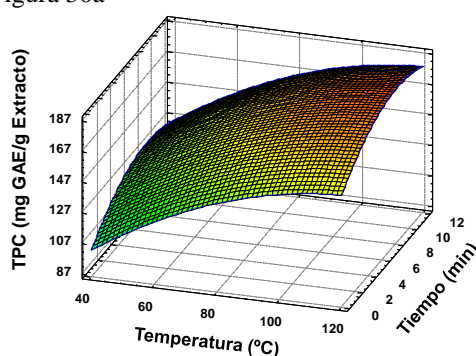


Figura 30c

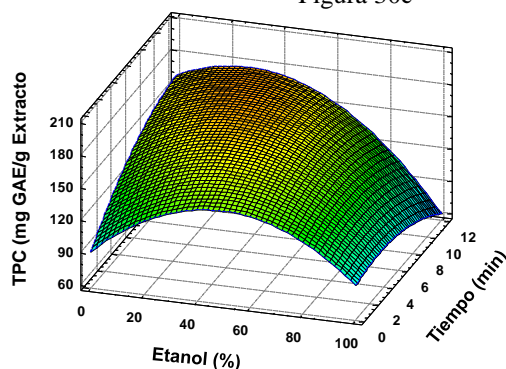


Figura 30d

Figura 30. Diagrama de Pareto estandarizado (a) y superficies de respuesta ($t = 6$) (b), ($Et = 50$) (c) y ($T = 80$) (d) para el TPC.

Como se puede observar, el disolvente de extracción ejerció la mayor influencia, seguido de la temperatura, mientras que el tiempo fue el factor menos significativo (Figura 30a). En este sentido, el principal efecto del disolvente fue de tipo cuadrático (Figuras 30a y 30b), mientras que el de la temperatura y tiempo de extracción fue lineal (Figuras 30a, 30c y 30d).

A partir de los datos experimentales, una vez llevado a cabo su análisis estadístico, se obtuvieron las distintas ecuaciones de regresión, así como las condiciones de extracción óptimas junto con el valor teórico previsto de cada una de las variables respuesta en esas condiciones de extracción (Tabla 10). Se observó que todas las variables encuentran sus condiciones óptimas de extracción en cantidades de etanol próximas al 30 %, una temperatura de 120 °C y 10 minutos como tiempo de extracción.

Tabla 10. Ecuaciones de regresión, coeficientes de las variables respuesta, condiciones óptimas de extracción y valor óptimo derivados del diseño del raspón.

	<i>Ecuación de regresión</i>	<i>R</i>	<i>Condiciones óptimas</i> (% Et; °C; min)	<i>Valor óptimo</i>
Rendimiento (%)	$Y = -2,05097 + 0,188423(Et) + 0,24681(T) + 2,91554(t) - 0,00271887(Et)^2 - 0,0115812(Et \times t) - 0,0144409(T \times t) - 0,0984341(t)^2$	0,952	25/120/4,5	32,6
TPC (mg GAE/g de extracto)	$Y = -15,954 + 2,10974(Et) + 1,94514(T) + 10,808(t) - 0,0212643(Et)^2 - 0,0807058(Et \times t) - 0,00779276(T)^2 - 0,408779(t)^2$	0,980	30/120/10	192,41
ABTS (mmol de trolox/g)	$Y = 0,578714 + 0,0369343(Et) + 0,0142628(T) + 0,112674(t) - 0,000382393(Et)^2 - 0,00147263(Et \times t)$	0,988	27/120/11	3,80
DPPH (mmol de trolox/g)	$Y = -0,238343 - 0,0209687(Et) + 0,00766806(T) + 0,0851506(t) - 0,000183361(Et)^2 - 0,0000407129(Et \times T) - 0,00071712(Et \times t) - 0,00273786(t)^2$	0,991	22/120/11	1,38

3.2.1.2. Oligómeros y polímeros.

Con el objetivo de determinar el contenido de compuestos fenólicos según su grado de polimerización, se llevó a cabo un análisis por HPLC-NP-DAD. El grupo de monómeros y oligómeros se cuantificó conjuntamente, grupo que será denominado a partir de ahora como oligómeros. Además, según su afinidad por la fase móvil, los polímeros se determinaron como polímeros solubles en metanol y como polímeros solubles en agua. Ambas fracciones se consideraron conjuntamente para determinar el contenido total de compuestos fenólicos poliméricos.

- Oligómeros

Al llevar a cabo el análisis estadístico de los datos experimentales relativos al contenido de oligómeros se observó que dichos datos no se ajustaron al modelo propuesto. No obstante, a partir de estos datos puede observarse una cierta tendencia (Tabla 9). En este sentido, la composición del solvente utilizado es el factor principal en la extracción de dichos compuestos, tal y como puede deducirse a partir del diagrama de Pareto (Figura 31a), donde el uso de elevados porcentajes de etanol supondría la obtención de los mayores contenidos de estos compuestos (Figura 31b). Por el contrario, la temperatura mostró un efecto negativo en la extracción de dichos compuestos, incrementándose su extracción a temperaturas inferiores a 80°C. Por su parte, el tiempo mostró un efecto cuadrático en la extracción de oligómeros, con un máximo de extracción en torno a los 10 minutos.

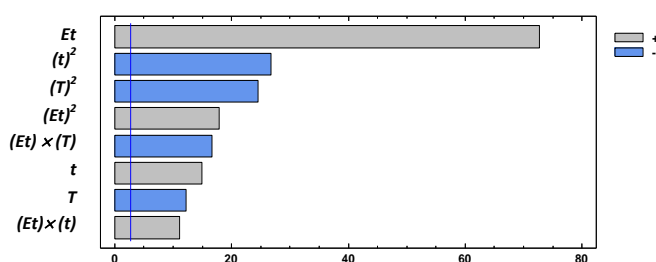


Figura 31a

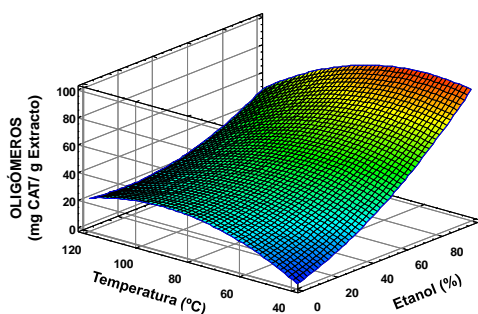


Figura 31b

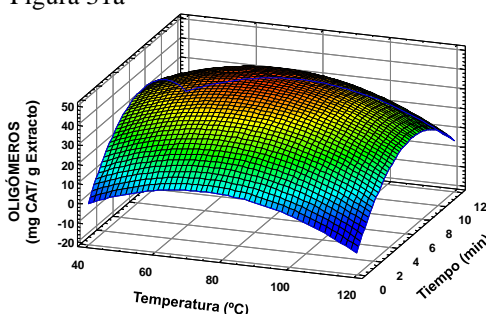


Figura 31c

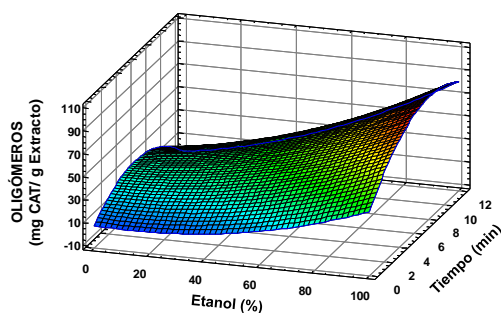


Figura 31d

Figura 31. Diagrama de Pareto (a) y superficies de respuesta ($t = 6$) (b), ($Et = 50$) (c) y ($T = 80$) (d) para el contenido de oligómeros.

- Polímeros

Nuevamente, el análisis estadístico de los datos obtenidos para los polímeros solubles en metanol, agua y polímeros totales (suma de ambos) concluyó que existía una falta de ajuste con el modelo propuesto, aunque con una tendencia general en todos ellos. A modo de ejemplo se muestran los gráficos obtenidos para los polímeros de metanol (Figura 32). Se observa un efecto cuadrático positivo para la temperatura y el tiempo. Por el contrario, en los gráficos de superficie, el porcentaje de etanol como solvente de extracción muestra una tendencia cuadrática negativa. Además, se registró una ligera interacción entre la temperatura y el porcentaje de etanol con el tiempo.

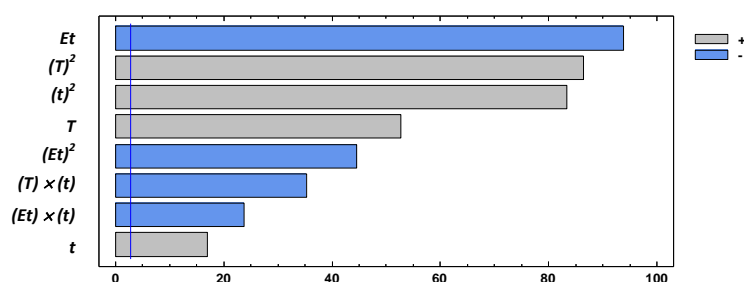


Figura 32a

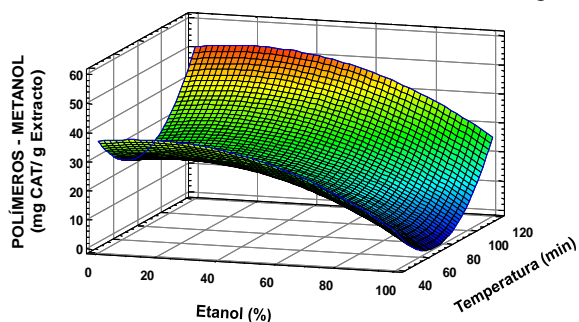


Figura 32b

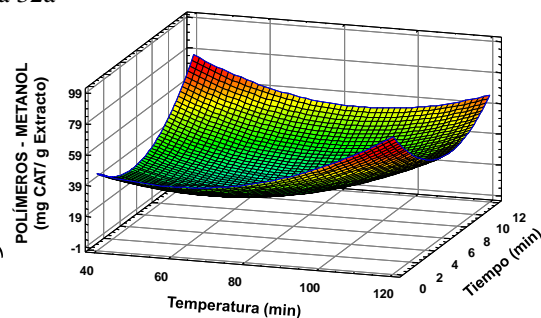


Figura 32c

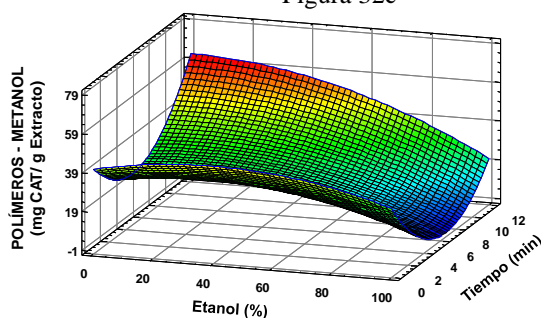


Figura 32d

Figura 32. Diagrama de Pareto (a) y superficies de respuesta (tiempo = 6) (b), (etanol = 50) (c) y (temperatura = 80) (d) para el contenido de polímeros solubles en metanol.

En este sentido, entre los datos experimentales destacaron dos condiciones de extracción, con resultados opuestos: las del experimento 12 (50 % de etanol, 120 °C, 6 minutos), que dio lugar al extracto con el mayor contenido de compuestos poliméricos

totales, y las del experimento 10 (100 % de etanol, 80 °C, 6 minutos) cuyo extracto presentaba un contenido especialmente bajo de este tipo de compuestos.

3.2.1.3. Correlación entre variables dependientes.

Con el objetivo de conocer la relación existente entre las distintas variables se llevó a cabo un análisis de correlación entre todas ellas (Tabla 10). De esta manera, se observó una alta correlación entre el TPC de los extractos y la actividad antioxidante de los mismos, independientemente del método utilizado para determinar la actividad antioxidante. En este sentido, la relación existente entre el TPC y la actividad antioxidante ha sido ampliamente descrita en extractos vegetales (2007; Du y col., 2009; Tabart y col., 2009), incluyendo extractos procedentes de la vid (Kondrashov y col., 2009; Teixeira y col., 2014). Asimismo, se comprobó la alta correlación existente entre los valores TEAC obtenidos por ambos métodos de actividad antioxidante.

Además, en la Tabla 11 se muestra que tanto la fracción de oligómeros (suma de monómeros y oligómeros) como la de polímeros (metanol y agua) contribuían a los datos obtenidos respecto a la actividad antioxidante (DPPH y ABTS) de los extractos analizados, así como al TPC; aunque la fracción de polímeros parece contribuir en mayor medida a dichos resultados, como muestra su mayor correlación con la actividad antioxidante y el TPC. En este sentido, Makris y col., (2007b) determinaron que todas las fracciones de compuestos fenólicos participan en la actividad antioxidante de los extractos de raspón, mientras que Karvela y col., (2011) indicaron que la fracción que gobierna la actividad antioxidante es principalmente la concerniente a las proantocianidinas (tanto en forma oligomérica como polimérica).

Tabla 11. Coeficientes de correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los extractos de raspón.

	<i>Oligómeros</i>	<i>Polímeros</i> (<i>metanol</i>)	<i>Polímeros</i> (<i>agua</i>)	<i>Polímeros</i> <i>totales</i>	<i>ABTS</i>	<i>DPPH</i>	<i>TPC</i>
<i>ABTS</i>	0,571*	0,621**	0,603**	0,621**	1,000	0,993***	0,993**
<i>DPPH</i>	0,617**	0,639**	0,615**	0,637**	0,993***	1,000	0,987**
<i>TPC</i>	0,557*	0,581**	0,576**	0,586**	0,993***	0,987***	1,000

* ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

Una vez analizados todos los resultados, se fijaron las condiciones de extracción óptimas en un 30 % de etanol, 120 °C y 10 minutos, respecto al TPC y a la actividad antioxidante.

La composición del solvente empleado y la temperatura son factores esenciales durante los procesos de extracción, donde el tiempo se encuentra generalmente, ligado a la temperatura (Kiassos y col., 2009; Li y col., 2011). En este sentido, a partir de un diseño experimental de extracciones SLE convencionales de dos variedades de raspón, empleando para ello mezclas de agua y etanol, Domínguez-Perles y col., (2014) concluyeron que el factor con mayor efecto sobre el TPC y el valor TEAC de los extractos fue el contenido de etanol. Dicho factor mostró un efecto cuadrático sobre ambas variables, coincidiendo así con los datos mostrados en este estudio. Del mismo modo, la temperatura se mostró como un factor importante, mientras que el tiempo influye de manera moderada o incluso, de forma no significativa.

Las mezclas de agua y etanol se han empleado con anterioridad para la extracción de compuestos fenólicos provenientes de partes de la vid como los raspones (Domínguez-Perles y col., 2014) y semillas (Yilmaz y Toledo, 2006; Makris y col., 2007b), así como otras partes leñosas (Luque-Rodríguez y col., 2006). Los resultados obtenidos en los diferentes estudios indican que la composición óptima del solvente de extracción ha de determinarse de un modo experimental para cada matriz, no existiendo por tanto unas condiciones universales para este factor (Karvela y col., 2009).

Es bien sabido que el incremento de la temperatura produce, en general, un incremento en el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos (Silva y col., 2007). Sin embargo, puesto que el aumento de la temperatura puede provocar la degradación de los compuestos fenólicos y que, durante los procesos de extracción intervienen simultáneamente diversos factores, es necesario estudiar cada matriz de un modo experimental (Domínguez-Perles y col., 2014). Al igual que sucede en este estudio, previamente se ha indicado que tiempos cortos de extracción a temperaturas elevadas producen extractos con mayores valores TEAC y TPC (Pompeu y col., 2009). En este sentido, algunos estudios ponen de manifiesto que la temperatura óptima de extracción de los compuestos fenólicos en diferentes matrices alimentarias puede situarse en torno a los 100 °C durante tiempos cortos, incluso a temperaturas superiores (Arapitsas y Turner, 2008; Wijngaard y col., 2012).

Con respecto a la extracción de las proantocianidinas, el incremento de la temperatura favoreció dicha extracción, mientras que elevadas concentraciones de etanol en el solvente extractante lo redujeron, incrementando por el contrario la extracción de los oligómeros fenólicos, mostrando un menor contenido de polímeros fenólicos cuando se considera tan solo un solvente de extracción (0 % o 100 % de etanol). En este sentido, Sun y Spranger, (2005) indicaron que la temperatura incrementa la extracción de las proantocianidinas siempre que no se alcancen temperaturas que provoquen degradación de las mismas. Asimismo, la mezcla de solventes aumenta la extracción de dichos compuestos al ampliarse el intervalo de polaridades, y por tanto, muestran una mayor capacidad de provocar la disrupción de estos compuestos con la matriz. En este mismo sentido, Karvela y col., (2011) indicaron que el mayor contenido de flavanoles se obtiene con una composición en etanol del 60 %, mientras que las condiciones óptimas para los oligómeros y proantocianidinas se sitúan del 44 % al 53 %.

3.2.2. Caracterización del extracto óptimo de raspón.

Una vez determinadas las condiciones de extracción que se consideraron como óptimas para la extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante (30 % de etanol, 120 °C y 10 minutos) se llevó a cabo la obtención de dicho extracto. Este extracto mostró un rendimiento de extracción de $28,65 \pm 1,54$ %, que resultó próximo al teórico (29,26 %).

3.2.2.1. Caracterización química.

Como primer paso para la caracterización química del extracto óptimo de raspón, se realizó el análisis de su composición fenólica por HPLC-RP-DAD, que permite la identificación de monómeros y algunos dímeros. Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización de su fracción polimérica.

- Análisis HPLC-RP-DAD.

En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos en el análisis del extracto óptimo de raspón

La muestra presentó un mayor contenido en flavonoides (7,42 mg/g de extracto) que en compuestos no flavonoideos (1,71 mg/g de extracto). En cuanto a los flavonoides, los flavanoles constituyeron el grupo mayoritario, en los cuales la catequina resultó ser el compuesto mayoritario, seguido del dímero B1 y de la epicatequina. Respecto a los

flavonoles, los únicos compuestos identificados fueron la quercetina y sus derivados, encontrándose en pequeñas cantidades, a excepción de la quercetina-3-O-glucurónido.

Dentro de los ácidos fenólicos se identificaron diversos compuestos, entre los que destacan los ácidos hidroxibenzoicos, resultando el más abundante el ácido gálico, junto con cantidades menores del ácido vainílico y ácido sirínico. Por el contrario, los ácidos hidroxicinámicos se hallaron en cantidades pequeñas, a excepción del ácido caftárico. Además, se identificaron en la muestra otros compuestos fenólicos, como los estilbenos, principalmente en forma de trans-resveratrol.

Tabla 12. Composición fenólica del extracto óptimo de raspón (mg de compuesto / g de extracto).

EXTRACTO ÓPTIMO DE RASPÓN			
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	0,541 ± 0,029
		Ácido Protocatéquico	0,008 ± 0,000
		Monogaloil glucósido	Trazas
		Ácido 4-hidroxibenzoico	0,048 ± 0,001
		Ácido Vainílico	0,224 ± 0,010
		Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	0,058 ± 0,004
		Ácido Sirínico	0,202 ± 0,015
		Ácido Elágico	0,073 ± 0,004
		Aldehído Protocatéquico	Coeluye
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	0,357 ± 0,003
		Ácido p-Cumárico	0,004 ± 0,000
		Ácido 3-Cumárico	0,003 ± 0,000
		Ácido Ferúlico	0,008 ± 0,000
	ESTILBENOS	trans-Piceido	0,016 ± 0,012
		trans-Resveratrol	0,141 ± 0,003
FLAVONIODES	FLAVANOLES	Catequina	2,422 ± 0,034
		Epicatequina	1,293 ± 0,039
		Galato de epicatequina	0,245 ± 0,005
		Dímero de procianidina B1	1,410 ± 0,034
		Dímero de procianidina B2	0,349 ± 0,025
	FLAVONOLES	Quercetina-3-O-galactósido (Hiperósido)	0,047 ± 0,000
		Quercetina-3-O-rutinósido (Rutina)	0,029 ± 0,000
		Quercetina-3-O-glucurónido	1,425 ± 0,001
		Quercetina-3-O-glucósido	0,106 ± 0,004
		Quercetina	0,005 ± 0,000

Coincidiendo con los datos hallados para este extracto, diversos estudios ponen de manifiesto que los flavanoles son los compuestos principales en el raspón, donde se ha observado que la catequina es el monómero mayoritario, encontrándose la epicatequina en menor medida (Sun y Spranger, 2005). Por su parte, el dímero B₂ se encuentra con frecuencia en los extractos de raspón, mientras que la B₁ y otros como la B₃ no siempre se indican en la literatura (Souquet y col., 2000; Anastasiadi y col., 2012).

Asimismo, diversos estudios indican que la composición de flavonoles del raspón está basada principalmente en la quercetina y sus derivados, destacando con más frecuencia los derivados glucuronidado y glucosilado (Souquet y col., 2000). Además, algunos autores también indican la presencia de otros derivados de quercetina en los raspones, como la rutina, el hiperósido o su forma aglicona (Makris y col., 2008; Anastasiadi y col., 2009; Barros y col., 2014).

Además, el ácido gálico es el principal ácido fenólico presente en extractos de raspón, seguido del ácido caftárico. Además, la bibliografía también indica la presencia de otros ácidos fenólicos como los ácidos protocatéquico, p-hidroxibenzoico, vainílico, sirínico, ácido cafeico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico (Anastasiadi y col., 2012; Delgado-Torré y col., 2012; González-Centeno y col., 2012).

También se ha descrito que el raspón constituye una fuente importante de estilbenos, principalmente en forma de trans-resveratrol y sus derivados, destacando entre ellos la ϵ -viniferina. Así, los datos hallados en este estudio coinciden con los determinados en la bibliografía al encontrarse cantidades notables de resveratrol, y en menor medida, de su derivado glucosilado (Souquet y col., 2000; Püssa y col., 2006; Makris y col., 2008; Anastasiadi y col., 2009).

- Análisis de proantocianidinas.

Como paso previo a la caracterización de la fracción fenólica polimérica del extracto, se procedió a la obtención de la fracción de proantocianidinas (PA). El método de hidrólisis ácida mediante tolueno- α -tiol, acoplado a cromatografía en HPLC-RP-DAD, permitió llevar a cabo la determinación de la composición fenólica de la fracción de proantocianidinas totales (oligoméricas conjuntamente con las poliméricas). Del mismo modo, para la determinación del contenido total de PA poliméricas se aplicó a dicha

fracción el método de la vainillina, expresando los resultados como mg de catequina por gramo de extracto.

La composición fenólica de las proantocianidinas en unidades monoméricas se caracterizó principalmente por unidades de extensión de epicatequina y en menor medida de catequina y galato de epicatequina. Por el contrario, las unidades terminales resultaron ser principalmente de catequina. De este modo, tan solo aproximadamente el 12 % de las unidades monoméricas se presentaron como formas galoiladas (Tabla 13).

Tabla 13. Caracterización fenólica de la fracción de proantocianidinas poliméricas del extracto óptimo de raspón.

Composición Fenólica (%)						
Unidades Terminales			Unidades de Extensión			
Catequina	Epicatequina	Galato de Epicatequina	Catequina	Epicatequina	Galato de Epicatequina	Epigallocatequina
6,32	1,07	0,81	8,27	71,27	11,59	0,68

Así, la elevada proporción de unidades de extensión frente a las unidades terminales indicó un grado de polimerización medio (mDP) equivalente a $12,22 \pm 0,68$, con una masa molecular media de $3543,41 \pm 195,87$.

Todos estos resultados coinciden con los obtenidos previamente por Souquet y col., (2000) en cuanto a la composición de las proantocianidinas de extractos de raspón de Merlot, aunque el grado medio de polimerización resultó ligeramente superior en este estudio. En este sentido, hay que considerar que diversos factores pueden afectar al valor del mDP, así como a su composición, tales como el disolvente empleado en la extracción, que puede ser más selectivo para un tipo de proantocianidinas que para otro, el grado de maduración o la añada (Sun y Spranger, 2005).

El contenido total de la fracción polimérica resultó ser $80,09 \pm 6,8$ mg de catequina/g de extracto, coincidiendo con los resultados obtenidos mediante cromatografía en fase normal aplicada al extracto óptimo de raspón. Asimismo, el contenido total en proantocianidinas coincide con el hallado por González-Centeno y col., (2012) para extracto de raspón de la variedad Merlot, situándose además, próximo a los contenidos encontrados para otras variedades de *Vitis vinifera* (Barros y col., 2014).

3.2.2.2. Caracterización funcional.

- Actividad antioxidante.

La determinación de la actividad antioxidante del extracto óptimo de raspón se llevó a cabo mediante dos métodos diferentes: el método del ABTS y del DPPH. Asimismo, se procedió a determinar su TPC (Tabla 14).

Tanto para la actividad antioxidante determinada por el método del ABTS como por el del DPPH, así como para el TPC, los valores obtenidos resultaron similares a los valores teóricos de los diseños experimentales.

Tabla 14. Valores de actividad antioxidante y TPC del extracto óptimo de raspón.

<i>Extracto Óptimo de Raspón</i>		
	<i>Valores Experimentales</i>	<i>Valores Teóricos</i>
ABTS (mmol Trolox/g Extracto)	3,55 ± 0,21	3,81
DPPH (mmol Trolox/g Extracto)	1,22 ± 0,06	1,37
TPC (mg GAE/g Extracto)	185,33 ± 2,94	192,41

Respecto a los valores de TPC obtenidos para los extractos de raspón, en la bibliografía puede observarse un amplio intervalo de valores. Así, el TPC del extracto óptimo de raspón se situó dentro del intervalo de valores determinados para extractos de diferentes variedades de *Vitis vinífera* (Makris y col., 2007; Llobera, 2012, Domínguez-Perles y col., 2014).

El método más encontrado en la bibliografía para determinar la actividad antioxidante de extractos de raspón es el método del DPPH, aunque las diferentes formas de expresión de los resultados dificultan la comparación de los mismos. Sin embargo, se puede decir que los resultados de este estudio coinciden con el intervalo de valores determinados para otras variedades de *Vitis vinífera* (Llobera y Canellas, 2008; Makris y col., 2007; Barros y col., 2014). Asimismo, estos resultados resultaron próximos a los determinados para extractos PLE a partir de otras partes leñosas de la vid, como ramas (Zhang y col., 2011).

Con respecto al valor TEAC obtenido por el método del radical ABTS, los resultados de este estudio fueron próximos a los determinados tanto para extractos SLE a partir de distintas variedades de *Vitis vinifera* (Barros y col., 2014) como para extractos PLE (González-Centeno y col., 2012). En este sentido, el extracto PLE a partir de la variedad Merlot resultó inferior al de este estudio.

Además, con la intención de poder realizar una comparación más exhaustiva entre la capacidad antioxidante del extracto obtenido, se llevó a cabo la determinación del valor TEAC mediante el método ORAC. Este valor resultó ser de $1477,03 \pm 172,74$ μ moles de trolox/g de extracto (equivalentes a 418 μ moles de trolox/g de raspón seco). Estos datos resultaron similares a los encontrados por González-Centeno y col., (2012) para extractos PLE de raspones obtenidos a partir de Merlot, que es la variedad utilizada en nuestro estudio.

- Actividad antiinflamatoria.

La medida de la actividad antiinflamatoria del extracto óptimo de raspón se realizó *in vitro* mediante la utilización de macrófagos humanos de la línea THP-1. Por un lado, se utilizó un modelo de inflamación en el que se incorpora al medio de cultivo de los macrófagos lipopolisacárido bacteriano (LPS) y, por otro, un modelo mediado por un proceso de oxidación, donde se adiciona en el medio de cultivo lipoproteínas de baja densidad de origen humano oxidadas (LDLox). Además, con el propósito de comparar la actividad antiinflamatoria del extracto con un fármaco antiinflamatorio de uso habitual, también se estudió la actividad antiinflamatoria de la indometacina.

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria se midió la secreción al medio de cultivo de los macrófagos de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β y IL-6 y la antiinflamatoria IL-10, empleando la técnica ELISA tipo sándwich.

Las concentraciones del extracto empleadas fueron de 2,5, 5, 10 y 20 μ g/mL, siendo 25 μ g/mL la máxima concentración que no mostraba citotoxicidad (datos no mostrados). En el caso de la indometacina la concentración empleada fue de 5 μ g/mL, sin toxicidad para las células.

En todos los ensayos se incluyó un control positivo, con los macrófagos estimulados con LPS o LDLox, en ausencia del extracto de raspón y un control negativo donde las células no se estimularon y representa el estado basal.

Los resultados obtenidos tras la estimulación de los macrófagos durante 24 horas con 75 µg/mL de LDLox se muestran en la Figura 33. En este sentido, la adición de LDLox al medio dio lugar a un incremento en la secreción de TNF-α de aproximadamente un 90 % comparado con la situación basal (control negativo). Cuando los macrófagos estimulados se mantuvieron en contacto con cualquiera de las concentraciones del extracto de raspón empleadas, se produjo una importante disminución en la liberación de TNF-α al medio de cultivo. De este modo, 20 µg/mL del extracto óptimo de raspón produjeron un descenso en la liberación de TNF-α hasta los niveles registrados por el control negativo y la indometacina.

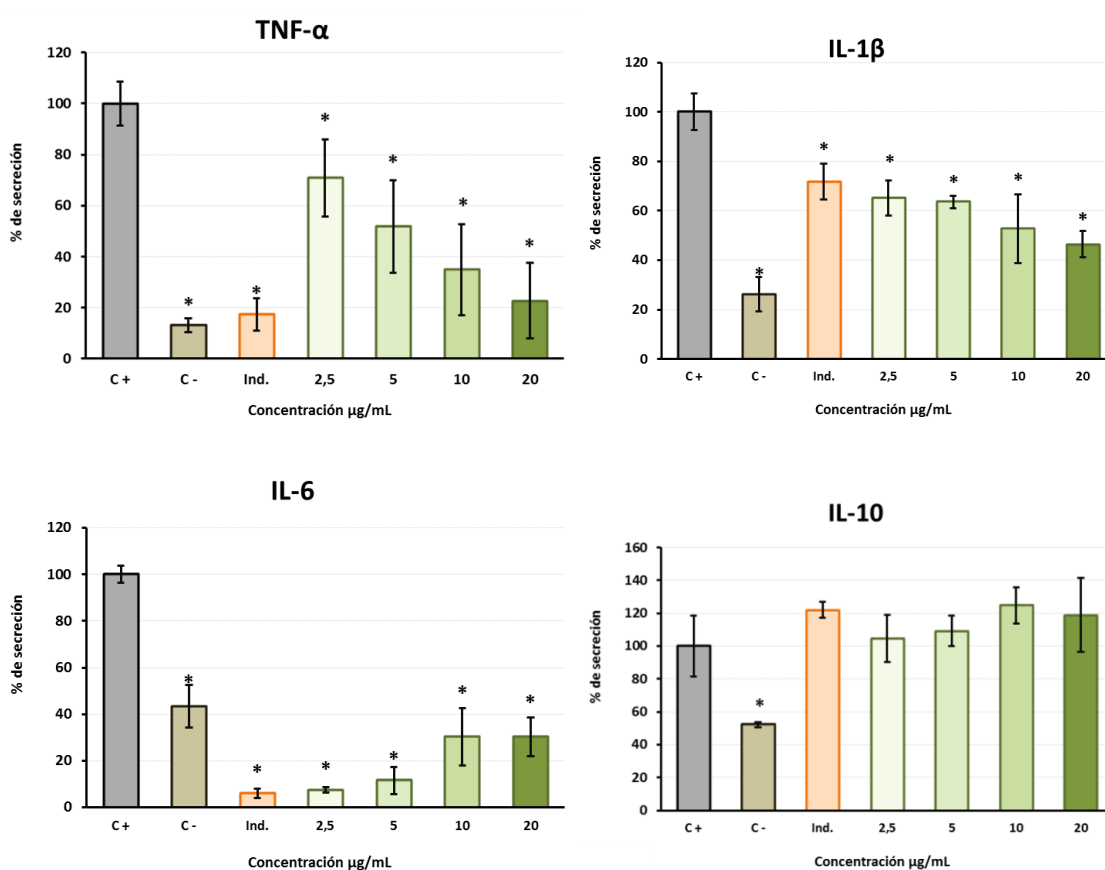


Figura 33. Secreción de interleuquinas en macrófagos activados con LDLox en presencia del extracto óptimo de raspón e indometacina (Ind.). *diferencias significativas respecto al control + ($p \leq 0,05$).

En el caso de la IL- 1β, la adición de LDLox también incrementa notablemente la secreción de esta citoquina. Al igual que ocurría con el TNF-α, todas las concentraciones de extracto de raspón empleadas producen una disminución significativa de la liberación de esta citoquina, no existiendo grandes diferencias entre las distintas concentraciones, obteniéndose también en este caso una inhibición en la secreción parecida a la obtenida con la indometacina.

La liberación de la IL-6 al medio de cultivo también aumentó con la adición de LDLox, siendo en este caso el incremento de alrededor de un 50 %. Respecto a las distintas concentraciones de extracto de raspón añadidas, en todos los casos se produjo una disminución de la secreción de esta interleuquina hasta niveles basales.

Con respecto a la última citoquina ensayada, la citoquina antiinflamatoria IL-10, se puede observar que en ningún caso se ha visto afectada por la adición de las distintas concentraciones del extracto.

Así, la incorporación de pequeñas cantidades de extracto óptimo de raspón dio lugar a una reducción en la secreción de todas las citoquinas proinflamatorias estudiadas, demostrándose así su capacidad antiinflamatoria, al paliar el estado inflamatorio provocado por la adición de LDLox al medio.

Los resultados obtenidos cuando los macrófagos se estimularon con 0,05 µg/mL de LPS se muestran en la Figura 34.

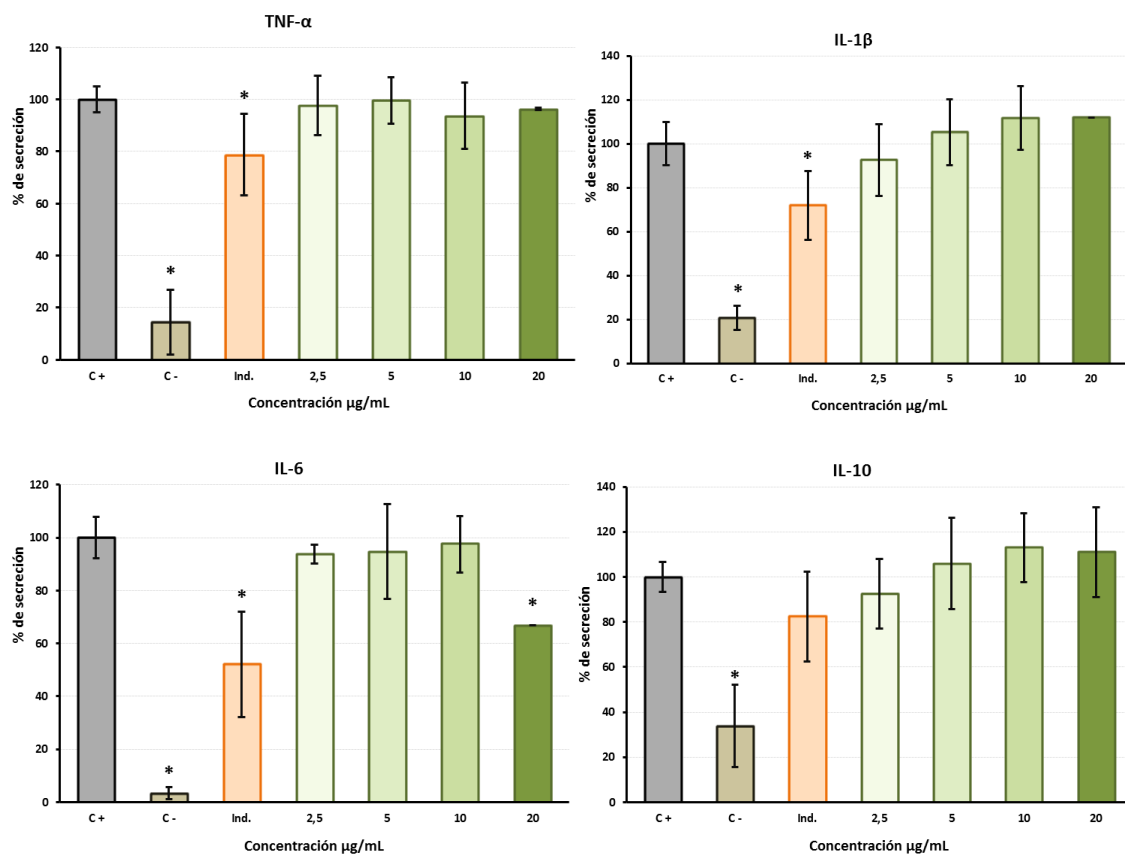


Figura 34. Secreción de interleuquinas en macrófagos activados con LPS en presencia del extracto óptimo de raspón e indometacina (Ind.). *diferencias significativas respecto al control + ($p \leq 0,05$).

En este caso también la estimulación de las células con LPS dio lugar a un aumento en la liberación de todas las citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, la adición del extracto óptimo de raspón al medio de cultivo no modificó la secreción de TNF- α ni de IL-1 β . En el caso de la IL-6 solo la concentración de 20 μ g/mL del extracto fue capaz de reducir la liberación al medio de dicha citoquina en un 30 %.

Para la citoquina antiinflamatoria IL-10, en los macrófagos estimulados con LPS tampoco se encontraron modificaciones en su liberación respecto al control positivo.

Cuando se comparan los resultados obtenidos con el extracto de raspón en los dos modelos de inflamación, se puede observar que el extracto presentó un mayor efecto antiinflamatorio en el modelo de inflamación mediado por oxidación. En este sentido, hay que indicar que en la bibliografía existen varios artículos que relacionan la actividad antioxidante de un extracto o compuesto y su actividad antiinflamatoria (Castilla y col., 2006; Montagut y col., 2009; Zhang y col., 2011). Así, diversos compuestos fenólicos se han descrito, por su actividad antioxidante, como sustancias efectivas para paliar la oxidación de las LDL, tanto mediada por macrófagos como en ausencia de los mismos (Vivancos y Moreno, 2008).

En este sentido, diversos estudios ponen de manifiesto que el vino, por su composición fenólica, es capaz de reducir la inflamación al evitar la oxidación de las LDL, aumentar el estatus antioxidante, reducir la captación de las LDLox al regular la expresión del transportador de membrana CD36 o reducir los ROS generados por los macrófagos en procesos inflamatorios mediados por LDLox (Fuhrman y col., 2005; Rosenblat y col., 2010, González y col., 2011). En este sentido, Rifici y col., (2002) indicaron que dicha actividad antiinflamatoria de los vinos es debida principalmente a los flavanoles (como la catequina o epicatequina), y en menor medida al ácido gálico, pues otros compuestos con actividades antiinflamatorias notables como la quercetina o el resveratrol pueden hallarse en cantidades insuficientes como para desarrollar un efecto importante.

Cuando se compara la actividad antiinflamatoria mostrada a 20 μ g/mL por el extracto de raspón se observa que posee una mayor capacidad antiinflamatoria que la de un extracto de flavanoles oligómeros obtenidos a partir de pieles de cacahuets (Tatsuno y col., 2012), mientras que fue similar a la determinada a 10 μ g/mL de un extracto de oligómeros de pepitas (Sakurai y col., 2010).

3.2.2.3. Biodisponibilidad.

Para la determinación de la biodisponibilidad del extracto óptimo de raspón, se llevó a cabo un proceso de digestión *in vitro*, seguido de la determinación de la absorción intestinal del extracto digerido.

3.2.2.3.1. Digestión *in vitro*.

Con objeto de determinar la influencia del proceso digestivo sobre la composición fenólica del extracto óptimo de raspón, así como sobre su actividad antioxidante, dicho extracto se sometió a una digestión *in vitro*. Así, tras cada etapa de la digestión (bucal, estomacal e intestinal) se obtuvo una muestra para la determinación de su composición fenólica y de su actividad antioxidante. Los resultados obtenidos se expresaron respecto a la disolución inicial del extracto óptimo (mg compuesto fenólico/L extracto y mmol trolox/L de extracto, respectivamente).

- Composición fenólica.

En la Tabla 15 se muestra el efecto de la digestión sobre el perfil fenólico del extracto óptimo según su grado de polimerización. Como se puede observar, tras la etapa bucal no se producen cambios significativos en el perfil fenólico del extracto, a excepción de una ligera pérdida de oligómeros, mientras que tras la digestión estomacal se observaron cambios importantes en la composición del extracto. Durante esta etapa se observa un descenso importante para todos los tipos de compuestos, a excepción de los polímeros de agua, destacando la pérdida de polímeros solubles en metanol. Al finalizar la digestión intestinal se observó un descenso en la cantidad de oligómeros y monómeros, manteniéndose constante la cantidad de polímeros detectados, respecto a la muestra obtenida tras la digestión estomacal.

Tabla 15. Perfil fenólico del extracto óptimo de raspón según su grado de polimerización durante el proceso digestivo (g de catequina por L de extracto).

	<i>Inicial</i>	<i>Bucal</i>	<i>Estomacal</i>	<i>Intestinal</i>
Monómeros y oligómeros	0,804 ± 0,012 ^a	0,732 ± 0,030 ^b	0,583 ± 0,023 ^c	0,335 ± 0,022 ^d
Polímeros solubles en metanol	2,096 ± 0,029 ^a	1,973 ± 0,075 ^a	0,382 ± 0,007 ^b	0,412 ± 0,062 ^b
Polímeros solubles en agua	0,279 ± 0,012 ^a	0,279 ± 0,013 ^a	0,271 ± 0,054 ^a	0,334 ± 0,122 ^a
Polímeros totales	2,375 ± 0,041 ^a	2,252 ± 0,088 ^a	0,553 ± 0,048 ^b	0,747 ± 0,184 ^b

^{a,b,c,d} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Como se comentó en el capítulo concerniente a las uvas, algunos autores apuntan que durante la etapa bucal pueden producirse pequeñas interacciones de los flavanoles monoméricos y oligoméricos con las proteínas salivales, lo que podría explicar el descenso de este grupo durante dicha etapa. Asimismo, respecto al descenso de compuestos fenólicos poliméricos, a pesar de que algunos autores indican que no existe degradación durante la fase estomacal, otros describen una posible degradación ácida de las proantocianidinas. Además, tal y como han observado otros autores previamente, podría producirse una interacción entre las proantocianidinas y las enzimas digestivas, provocando así la precipitación conjunta de ambas.

La influencia del proceso digestivo, sobre los compuestos fenólicos individuales del extracto se muestra en la Tabla 16. De modo general, durante la etapa bucal no se observaron cambios en la composición del extracto, produciéndose los cambios más significativos durante la etapa estomacal e intestinal. Así, estos resultados confirman lo observado previamente para el efecto de la digestión sobre los compuestos fenólicos según el grado de polimerización.

Los ácidos fenólicos, tanto hidroxibenzoicos como hidroxicinámicos, se vieron poco afectados por el proceso de la digestión, aunque con algunas excepciones. En este sentido, entre los ácidos hidroxibenzoicos hay que destacar pérdidas notables para el ácido gálico y su derivado glucosilado, así como para el ácido 2,3-dihidroxibenzoico y en menor medida, para el ácido elágico. Por el contrario, se observó un incremento en la cantidad galato de etilo, el cual podría provenir de la degradación de estructuras más complejas, como las proantocianidinas galoiladas, tal y como pusieron de manifiesto Martínez-Ortega y col., (2001) para el caso del ácido gálico.

El efecto de la digestión sobre los flavanoles resultó notablemente más intenso que para el resto de compuestos fenólicos. La etapa estomacal provocó un descenso importante en la cantidad de catequina, el dímero B₂ y el galato de epicatequina, mientras que dicho descenso fue menos acusado para la epicatequina y el dímero B₁. Durante la digestión intestinal se produjeron descensos importantes en las cantidades de todos los compuestos de este grupo. Así, tras el proceso digestivo se observó una pérdida del 87%, 94% y 84% para la catequina, la epicatequina y el dímero B₁, respectivamente.

Tabla 16. Composición fenólica del extracto óptimo de raspón durante el proceso digestivo (mg de compuesto / L de extracto).

			EXTRACTO ÓPTIMO DE RASPÓN			
			Inicial	Bucal	Estomacal	Intestinal
ÁCIDOS FENÓLICO	BENZOICOS	Ácido Gálico	18,66 ± 0,08 ^b	19,34 ± 0,04 ^a	16,20 ± 0,05 ^c	8,11 ± 0,72 ^d
		Ácido Protocatéquico	0,31 ± 0,00 ^a	0,32 ± 0,00 ^a	0,30 ± 0,01 ^a	0,32 ± 0,05 ^a
		Monogaloil glucósido	0,35 ± 0,03 ^a	0,31 ± 0,01 ^b	Nd	Nd
		Ácido 4-hidroxibenzoico	1,74 ± 0,10 ^c	1,79 ± 0,05 ^c	2,03 ± 0,07 ^b	2,22 ± 0,12 ^a
		Ácido Vainfílico	6,28 ± 0,38 ^a	6,03 ± 0,56 ^a	Coeluye	Coeluye
		Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	0,75 ± 0,05 ^a	0,81 ± 0,04 ^a	Nd	Nd
		Ácido Sirínico	8,30 ± 0,12 ^b	7,83 ± 0,36 ^c	8,73 ± 0,05 ^a	8,85 ± 0,23 ^a
		Galato de etilo	0,29 ± 0,04 ^c	0,31 ± 0,05 ^c	0,43 ± 0,01 ^b	0,64 ± 0,01 ^a
		Ácido Elágico	2,32 ± 0,11 ^a	2,15 ± 0,07 ^b	1,12 ± 0,02 ^d	1,38 ± 0,04 ^c
		Aldehído protocatéquico	Coeluye	Coeluye	Coeluye	Coeluye
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	4,96 ± 0,06 ^b	5,20 ± 0,01 ^a	4,44 ± 0,04 ^c	3,91 ± 0,16 ^d
		Ácido Cafeico	0,17 ± 0,01 ^b	0,19 ± 0,00 ^b	0,33 ± 0,01 ^a	Coeluye
		Ácido p-Cumárico	Coeluye	Coeluye	Coeluye	Coeluye
		Ácido 3-Cumárico	0,08 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,00 ^a	Nd	Nd
		Ácido Ferúlico	0,26 ± 0,00 ^a	0,27 ± 0,00 ^a	0,21 ± 0,01 ^b	Coeluye
	ESTILBENOS	trans-Piceido	0,43 ± 0,00 ^a	0,45 ± 0,00 ^a	0,41 ± 0,01 ^b	0,42 ± 0,01 ^b
		trans-Resveratrol	7,90 ± 0,12 ^a	8,27 ± 0,03 ^a	6,53 ± 0,03 ^b	5,97 ± 0,45 ^c
FLAVONOIDES	FLAVANOLES	Catequina	82,46 ± 0,31 ^a	82,65 ± 5,06 ^a	56,55 ± 0,07 ^b	11,03 ± 1,11 ^c
		Epicatequina	25,52 ± 0,09 ^a	26,76 ± 0,69 ^a	20,49 ± 0,02 ^b	1,56 ± 0,86 ^c
		Galato de epicatequina	6,90 ± 0,08 ^a	7,03 ± 0,11 ^a	Nd	Nd
		Dímero B1	46,86 ± 0,12 ^a	47,30 ± 1,66 ^a	43,01 ± 0,11 ^b	7,45 ± 1,33 ^c
		Dímero B2	15,24 ± 0,8 ^a	15,64 ± 0,30 ^a	8,08 ± 0,20 ^b	Coeluye
	FLAVONÓLES	Hiperósido	0,55 ± 0,02 ^a	0,53 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,03 ^c	0,28 ± 0,10 ^b
		Rutina	0,57 ± 0,02 ^a	0,54 ± 0,02 ^a	0,44 ± 0,02 ^b	0,41 ± 0,05 ^b
		Quercetina-3-O-glucurónido	23,51 ± 0,30 ^a	23,91 ± 0,17 ^a	16,66 ± 0,05 ^c	18,88 ± 1,52 ^b
		Quercetina-3-O-glucósido	3,19 ± 0,11 ^a	3,31 ± 0,11 ^a	2,46 ± 0,07 ^b	2,19 ± 0,08 ^c
		Quercetina	0,13 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,00 ^a	0,04 ± 0,00 ^b	Nd

^{a,b,c,d} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Estos resultados ya se observaron tras la digestión de las uvas. Este fenómeno podría estar relacionado con las precipitaciones de flavanoles monoméricos y oligoméricos que tienen lugar durante la fase gástrica e intestinal (Serra y col., 2010), así como por descomposiciones de las proantocianidinas debido al pH ácido del estómago o

transformaciones de los flavanoles como la autoasociación, conversiones o dimerización (Zhu y col., 2002; Spencer y col., 2001; Krook y col., 2012).

Coincidiendo con los datos obtenidos para la digestión del extracto óptimo de raspón, Record y Lane, (2001) observaron pérdidas en diversos flavanoles durante la digestión gástrica de té, seguido de una pérdida más intensa en la digestión intestinal, mientras que Stalmach y col., (2012) observaron el mismo efecto para los flavanoles de un mosto de uva tinta. Del mismo modo, Laurent y col., (2007) mostraron una extensa pérdida de catequina, epicatequina y los dímeros B₂ y B₃ tras la digestión de un extracto de pepitas como consecuencia, principalmente, de su unión a las enzimas digestivas.

Tanto para los flavonoles como para los estilbenos, se observaron ligeros descensos durante la etapa estomacal, donde los cambios fueron menos pronunciados para la rutina. Durante la etapa intestinal únicamente se produjeron pérdidas significativas en la quercetina y en su derivado glucosilado.

- Actividad antioxidante.

El efecto de la digestión sobre la actividad antioxidante del extracto óptimo de raspón se analizó mediante el método del DPPH para cada una de las etapas de la digestión. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 35, donde se puede observar que durante la etapa bucal no se produjeron cambios significativos en la actividad antioxidante. Por el contrario, durante la etapa estomacal se observó un notable descenso de la actividad antioxidante, manteniéndose esta actividad durante la etapa intestinal. Con todo ello, tras el proceso digestivo se produjo un descenso de la actividad antioxidante del extracto equivalente al 55 % del valor inicial.

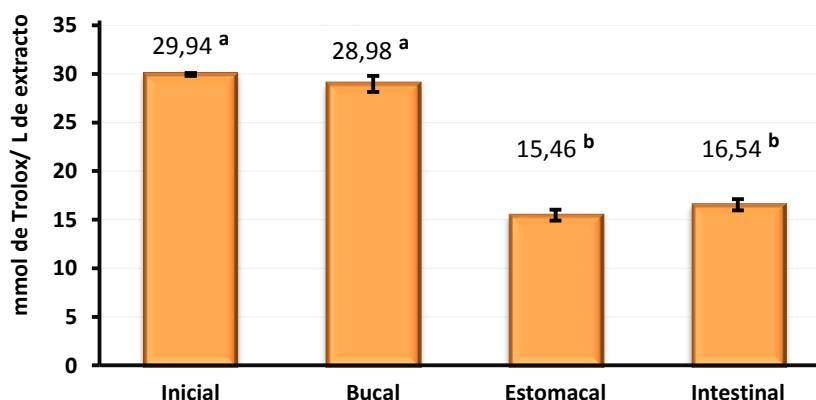


Figura 35. Valor TEAC del extracto óptimo de raspón durante el proceso digestivo.

^{a,b}. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Además de la actividad antioxidante, también se determinó por el método de Folin Ciocalteu el contenido de compuestos fenólicos totales del extracto óptimo de raspón tras el proceso digestivo. Los resultados obtenidos indicaron que la digestión del extracto provocó un descenso del TPC equivalente a un 52 % del valor inicial (Figura 36). Este dato nos indica que la pérdida de actividad antioxidante detectada durante el proceso digestivo parece estar relacionada con la pérdida de compuestos fenólicos totales durante el mismo.

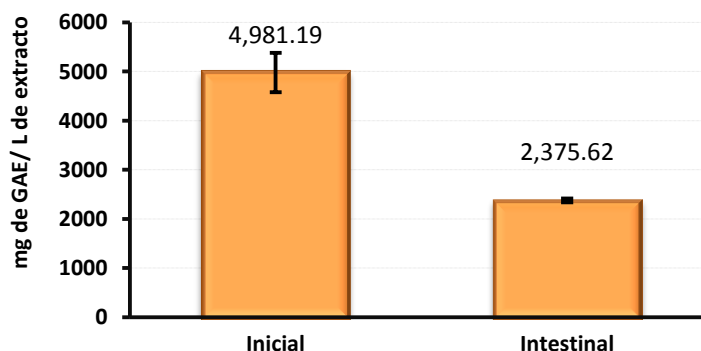


Figura 36. TPC al inicio y final del proceso digestivo.

Además, se estudió la relación existente entre la actividad antioxidante y las diferentes fracciones según su grado de polimerización mediante un análisis de correlación simple (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis de correlación simple para el valor TEAC y la composición fenólica durante la digestión.

	DPPH - Oligómeros	DPPH – Polímeros (Metanol)	DPPH – Polímeros (Agua)	DPPH – Polímeros Totales
R	0,824*	0,999***	0,173	0,997***

* ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

Dichos resultados indican que la actividad antioxidante del extracto, a lo largo del proceso de la digestión, está relacionada tanto con los oligómeros (monómeros y oligómeros) como con los polímeros fenólicos. Sin embargo, hay que destacar la fuerte correlación obtenida para la fracción de los polímeros solubles en metanol. Estos resultados indican que la pérdida de polímeros solubles en metanol durante el proceso de digestión estaría muy relacionada con la disminución encontrada en la actividad antioxidante del extracto durante la digestión, aunque también habría que considerar la pérdida de monómeros y oligómeros durante dicho proceso.

Tal y como se ha descrito previamente, los flavanoles y especialmente las proantocianidinas mantienen una estrecha relación con la actividad antioxidante de los extractos de raspón. Así, el acusado descenso de dicha actividad durante la etapa estomacal podría estar relacionado con la interacción de las enzimas digestivas con las proantocianidinas, tal como se ha descrito previamente que puede suceder.

No se encontraron estudios previos en la bibliografía respecto al efecto de la digestión sobre la composición y actividad antioxidante de extractos de raspón. No obstante, existen diversos estudios donde se simula la digestión de otros productos derivados de la vid tales como subproductos de la vinificación (Laurent y col., 2007; Fernández y Labra, 2007), vinos (Martínez-Ortega y col., 2001; Noguer y col., 2008), mosto (Stalmach y col., 2012) o del fruto entero (Tagliazucchi y col., 2010). Asimismo, Liang y col., (2012) detectaron pérdidas pronunciadas de compuestos fenólicos totales durante la etapa estomacal, mientras que posteriormente, se mantenían constantes durante la fase intestinal a pesar de observarse una amplia degradación de compuestos. Coincidiendo con estos autores, en este estudio la fase estomacal e intestinal resultaron ser las etapas con mayor efecto en la composición de los extractos durante el proceso digestivo.

3.2.2.3.2. *Absorción intestinal.*

Tras el proceso de la digestión, se evaluó la absorción intestinal del extracto digerido mediante el modelo celular Caco-2, analizándose la composición fenólica y actividad antioxidante tanto de la fracción no absorbida como de la fracción biodisponible. Como paso previo, el digerido se filtró con 0,45 μm con la intención de reducir los polímeros fenólicos y precipitados de la digestión

- *Composición fenólica.*

A partir del extracto digerido se simuló el proceso de absorción intestinal para cada compuesto fenólico identificado (Tabla 18). Dicho modelo permite obtener una fracción biodisponible (basolateral), así como una fracción no absorbida (apical).

Tabla 18. Absorción intestinal de los compuestos fenólicos presentes en la fase intestinal (mg de compuesto / L de extracto).

			EXTRACTO ÓPTIMO DE RASPÓN		
			Digerido	Apical	Basolateral
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	8,11 ± 0,72	6,51 ± 0,06	1,93 ± 0,23
		Ácido Protocatéquico	0,32 ± 0,05	0,25 ± 0,01	0,07 ± 0,00
		Monogaloil glucósido	Nd	Nd	Nd
		Ácido 4-hidroxibenzoico	2,22 ± 0,12	1,46 ± 0,35	0,85 ± 0,12
		Ácido Vainíllico	Coeluye	Nd	Nd
		Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	Nd	Nd	Nd
		Ácido Siríngico	8,85 ± 0,23	6,35 ± 0,18	2,28 ± 0,05
		Galato de etilo	0.64 ± 0,01	0,28 ± 0,06	Nd
		Ácido Elágico	1,38 ± 0,04	0,95 ± 0,00	Nd
		Aldehído Protocatéquico	Coeluye	Coeluye	0,13 ± 0,01
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	3,91 ± 0,16	2,13 ± 0,08	0,52 ± 0,02
		Ácido Cafeico	Coeluye	Nd	Nd
		Ácido p-Cumárico	Coeluye	0,21 ± 0,00	0,07 ± 0,00
		Ácido 3-Cumárico	Nd	Nd	Nd
		Ácido Ferúlico	Coeluye	Nd	0,2 ± 0,02
	ESTILBENOS	trans-Piceido	0,42 ± 0,01	0,38 ± 0,00	0,08 ± 0,00
		trans-Resveratrol	5,97 ± 0,45	0,17 ± 0,01	0,58 ± 0,01
		Metabolito de Resveratrol	Nd	4,16 ± 0,04	2,10 ± 0,02
FLAVONOIDES	FLAVANOLES	Catequina	11,03 ± 1,11	Coeluye	6,46 ± 0,02
		Epicatequina	1,56 ± 0,86	Nd	Nd
		Galato de epicatequina	Nd	Nd	Nd
		Dímero B1	7,45 ± 1,33	3,38 ± 0,24	Nd
		Dímero B2	Coeluye	Nd	Nd
	FLAVONOLES	Hiperósido	0,28 ± 0,10	0,27 ± 0,0	Nd
		Rutina	0,41 ± 0,05	0,39 ± 0,01	Nd
		Quercetina-3-O-glucurónido	18,88 ± 1,52	15,21 ± 0,13	1,21 ± 0,02
		Quercetina-3-O-glucósido	2,19 ± 0,08	1,14 ± 0,01	Trazas
		Quercetina	Nd	Nd	Nd

De modo general, en la fracción biodisponible se hallaron tanto ácidos hidroxibenzoicos como ácidos hidroxicinámicos. En este sentido, el ácido 4-hidroxibenzoico mostró un elevado porcentaje de absorción con respecto a la cantidad de este compuesto detectada en el digerido (38 %), seguido del ácido sirínico (26%) y ácido gálico (24 %). Además, se encontraron pequeñas cantidades de ácido caftárico (13 %).

Con respecto a los flavanoles, en la fracción biodisponible tan solo se observó la catequina, con un porcentaje de absorción equivalente al 59 % con respecto a las cantidades presentes en el digerido.

Para el grupo de los flavonoles solo se detectó en el compartimento basolateral una pequeña cantidad de quercetina-3-O-glucurónido.

Es importante indicar que dentro del grupo de los estilbenos la cantidad biodisponible de trans-resveratrol fue de tan solo el 10 %, aunque en esta fracción se detectó una cantidad importante de un metabolito de dicho compuesto (35 %).

De este modo, como resumen se puede indicar que el compuesto que presentó mayor biodisponibilidad fue la catequina seguida de los ácidos siríngico y gálico.

- Actividad antioxidante.

Con objeto de determinar la influencia del proceso de absorción intestinal sobre la actividad antioxidante del digerido del extracto de raspón se analizó dicha actividad en la fracción apical y la basolateral por el método de DPPH (Figura 37). Asimismo, se determinó el TPC de estas fracciones por el método de Folin-Ciocalteu (Figura 38).

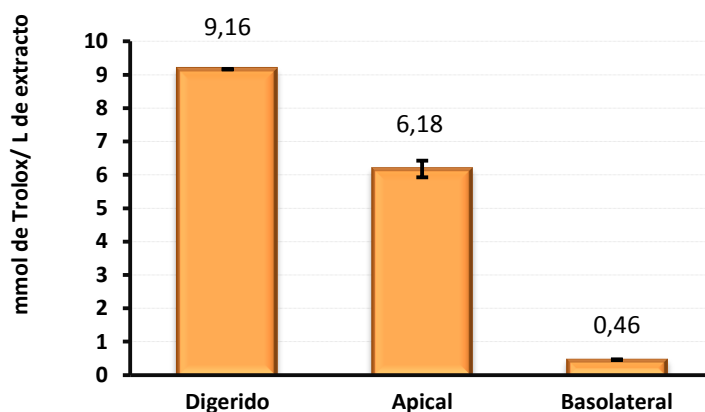


Figura 37. Valor TEAC en la fracción biodisponible tras seis horas de absorción intestinal

La fracción biodisponible mostró una actividad equivalente a $0,46 \pm 0,002$ mmol de trolox/L de extracto. Además, tras el proceso de absorción intestinal, en la fracción biodisponible (basolateral) se observó aproximadamente un 11 % del contenido en compuestos fenólicos del digerido de raspón, con un valor equivalente a 110,4 mg GAE/L de extracto (Figura 38).

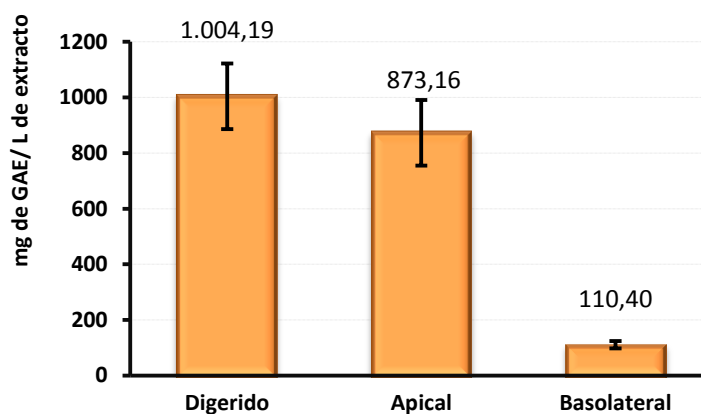


Figura 38. TPC en la fracción biodisponible tras seis horas de absorción intestinal.

En este sentido, se puede concluir que la actividad antioxidante determinada en la fracción biodisponible estaría aportada por los compuestos fenólicos presentes en la fracción basolateral, fundamentalmente por la catequina junto con el ácido sirínico, el ácido gálico y el metabolito de resveratrol.

Como ya se ha indicado previamente en el apartado de las uvas, diversos estudios han demostrado la absorción intestinal de ácidos fenólicos como el gálico, el protocatéquico y el sirínico (Konishi y col., 2003), la forma glucuronidada de la quercetina (Gee y col., 1998), así como el estilbeno resveratrol (Kaldas y col., 2003) junto con su forma glucosilada (Henry-Vitrac y col., 2006).

En relación con la importante cantidad de catequina detectada en el compartimento basolateral, Goldberg y col., (2003) observaron la presencia sanguínea de catequina, resveratrol y quercetina tras el consumo de vino, así como la presencia de catequina en plasma tras el consumo de vino reconstituido (Bell y col., 2000). Del mismo modo, Serra y col., (2010) observaron una amplia absorción en ratas de catequina (42 – 43 %) y epicatequina (55 – 57 %) provenientes de un digerido de pepitas, así como cantidades notablemente inferiores de epicatequina galato, dímeros y trímeros.

Finalmente, cabe destacar que durante la absorción a nivel intestinal del resveratrol se ha descrito una metabolización pronunciada a formas sulfatadas y glucuronidadas, dependiente de la dosis. Así, coincidiendo con los resultados de este estudio, a bajas dosis se produce una extensa metabolización de compuestos y una baja acumulación intracelular, reduciendo la biodisponibilidad de la forma aglicona, mientras que a dosis elevadas se produce un incremento en la acumulación intracelular intestinal, y por tanto, un aumento en la biodisponibilidad de la forma aglicona (Maier-Salamon y col., 2006).

Con todo ello, podemos concluir que el extracto óptimo de raspón presentaba una elevada actividad antioxidante, debida al importante contenido en compuestos fenólicos de la muestra. Sin embargo, la mayor parte de dichos compuestos eran de origen polimérico, los cuales sufren una fuerte reducción durante el proceso digestivo como consecuencia de su degradación durante el proceso digestivo o de su interacción de estos con las enzimas digestivas, traduciéndose en una fuerte reducción de la actividad antioxidante del extracto tras el proceso digestivo. No obstante, a pesar del descenso producido durante dicho proceso, la fracción biodisponible tras la absorción intestinal del digerido de raspón contiene una cierta cantidad de compuestos fenólicos monoméricos, en su mayor parte catequina, que serían los responsables de la actividad antioxidante que presenta dicha fracción.

3.2.3. Obtención y caracterización de un extracto enriquecido en monómeros.

Tal y como se ha indicado anteriormente, durante el proceso de la digestión se produce una pérdida importante de los compuestos fenólicos poliméricos, provocando así un elevado descenso en la actividad antioxidante del extracto óptimo de raspón en dicho proceso. De este modo, con objeto de reducir los compuestos fenólicos poliméricos e incrementar los monoméricos que son previsiblemente más biodisponibles, se llevaron a cabo dos estrategias diferentes. La primera estrategia consistió en la aplicación de un proceso de ultrafiltración mediante membranas de 10 KDa, mientras que la segunda consistió en la obtención de un extracto de PLE en condiciones de extracción tales que permitan conseguir un extracto con un notable contenido en monómeros y un bajo contenido en polímeros fenólicos.

Respecto al proceso de ultrafiltración, se produjeron dos extractos nuevos. Uno de ellos correspondiente a la fracción del extracto original capaz de atravesar la membrana, al que denominaremos permeado, y por otro lado, la fracción que no atravesó la membrana y que constituye el extracto denominado retenido. El rendimiento de ultrafiltración en el permeado fue de un 52 % (52,33 g de permeado/100 g de extracto óptimo de raspón). La determinación de la composición fenólica del permeado y retenido, caracterizado según el grado de polimerización, corroboró que el permeado estaba exento de compuestos fenólicos poliméricos, destacando un enriquecimiento importante en compuestos fenólicos monoméricos (Figura 39). Por su parte, el extracto retenido resultó enriquecido en los polímeros fenólicos.

Para llevar a cabo la segunda estrategia de enriquecimiento se tuvieron en cuenta los datos obtenidos previamente en el diseño experimental. Así, cuando se estudia la composición fenólica de los extractos del diseño por grupos de compuestos fenólicos según su grado de polimerización, se puede observar que en el experimento 10 (100 % etanol, 80 °C, 6 minutos) la cantidad de polímeros extraídos resulta notablemente inferior a la que presenta el extracto óptimo de raspón (Tabla 19). Por lo que teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el apartado anterior, donde tras el proceso de la digestión y absorción intestinal la mayoría de la actividad antioxidante observada se atribuye solo a la presencia de monómeros y oligómeros, se consideró interesante llevar a cabo el estudio de este extracto, al no ser necesaria la aplicación de un proceso de ultrafiltración para reducir así el contenido de su fracción polimérica.

Tabla 19. Perfil fenólico del extracto óptimo y etanólico de raspón según su grado de polimerización (mg de catequina/g de extracto).

	<i>Óptimo</i>	<i>Etanólico</i>
Monómeros y Oligómeros	26,8	98,73
Polímeros solubles en metanol	69,86	4,06
Polímeros solubles en agua	9,3	6,91
Polímeros totales	79,16	10,97

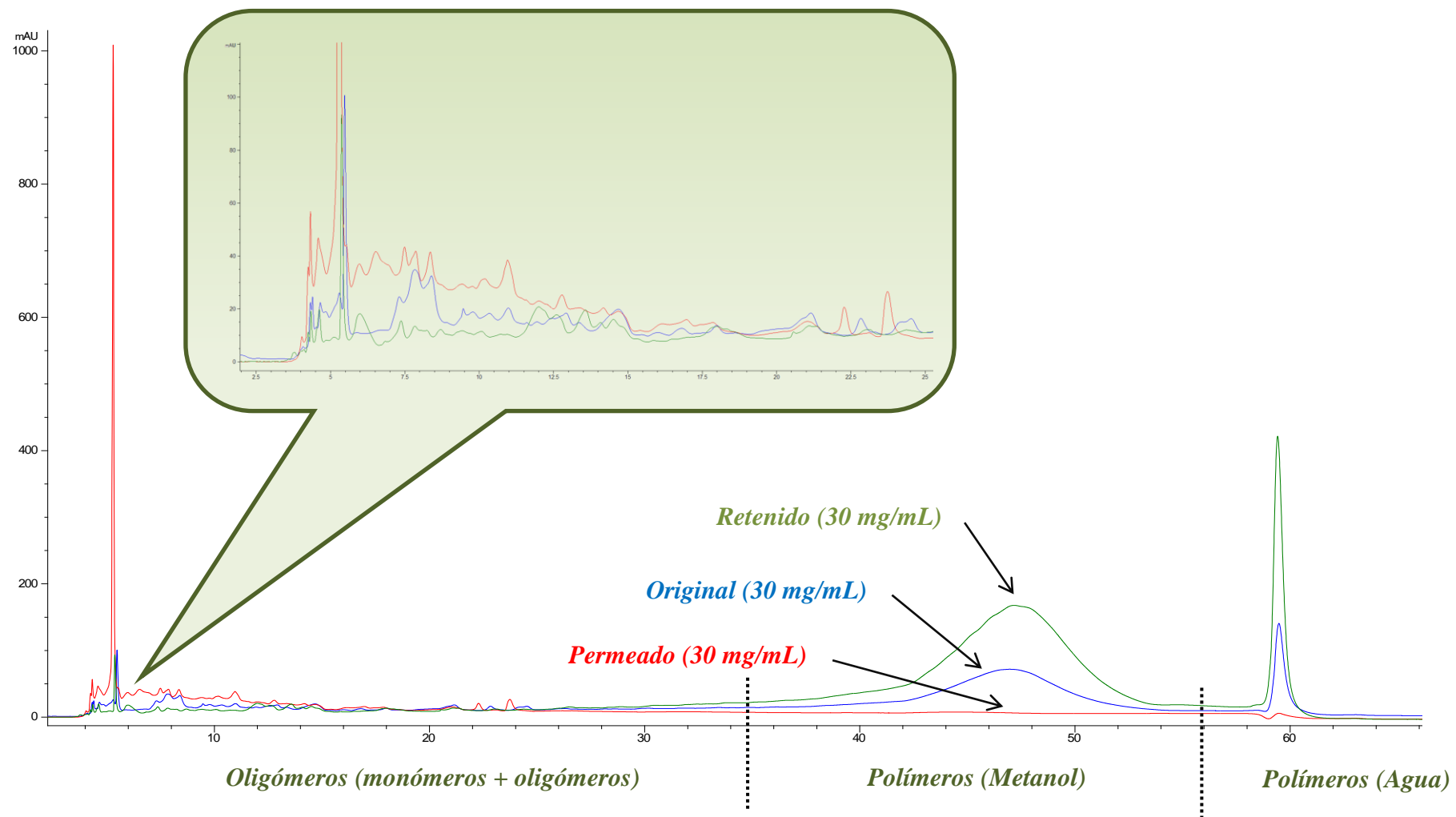


Figura 39. Perfil fenólico del extracto óptimo de raspón y del permeado y retenido según su grado de polimerización (30mg/mL).

3.2.3.1. Caracterización química.

La caracterización de la composición fenólica del permeado y del extracto etanólico de raspón se llevó a cabo por HPLC-RP, mostrándose los resultados obtenidos en la Tabla 20.

Tabla 20. Composición fenólica del extracto óptimo de raspón, su permeado y del extracto etanólico (mg de compuesto / g de extracto).

			ÓPTIMO	PERMEADO	ETANÓLICO
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	0,541 ± 0,029 ^c	1,000 ± 0,044 ^a	0,726 ± 0,038 ^b
		Ácido Protocatéquico	0,008 ± 0,000 ^c	0,020 ± 0,001 ^a	0,017 ± 0,000 ^b
		Monogaloil glucósido	Trazas	0,043 ± 0,003 ^a	0,001 ± 0,000 ^b
		Ácido 4-hidroxibenzoico	0,048 ± 0,001 ^c	0,107 ± 0,002 ^b	0,173 ± 0,001 ^a
		Ácido Vainílico	0,224 ± 0,010 ^b	0,235 ± 0,047 ^b	0,505 ± 0,016 ^a
		Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	0,058 ± 0,004 ^a	0,052 ± 0,004 ^a	0,025 ± 0,004 ^c
		Ácido Sirínico	0,202 ± 0,015 ^c	0,416 ± 0,018 ^b	0,489 ± 0,020 ^a
		Ácido Elágico	0,073 ± 0,004 ^b	0,078 ± 0,001 ^b	0,130 ± 0,007 ^a
		Aldehído Protocatéquico	Coeluye	0,023 ± 0,001	Coeluye
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	0,357 ± 0,003 ^a	0,256 ± 0,011 ^b	0,183 ± 0,001 ^c
		Ácido p-Cumárico	0,004 ± 0,000 ^b	Coeluye	0,009 ± 0,000 ^a
		Ácido 3-Cumárico	0,003 ± 0,000 ^b	0,008 ± 0,001 ^a	Nd
		Ácido Ferúlico	0,008 ± 0,000 ^b	0,017 ± 0,002 ^a	Coeluye
FLAVONOIDES	ESTILBENOS	trans-Piceido	0,016 ± 0,012 ^c	0,027 ± 0,000 ^b	0,049 ± 0,002 ^a
		trans-Resveratrol	0,141 ± 0,003 ^c	0,464 ± 0,020 ^b	1,215 ± 0,036 ^a
	FLAVANOLES	Catequina	2,422 ± 0,034 ^c	4,595 ± 0,238 ^b	6,662 ± 0,381 ^a
		Epicatequina	1,293 ± 0,039 ^c	2,653 ± 0,146 ^a	1,435 ± 0,073 ^b
		Galato de epicatequina	0,245 ± 0,005	0,427 ± 0,041	0,466 ± 0,009
		Dímero B1	1,410 ± 0,034 ^b	1,581 ± 0,056 ^a	1,028 ± 0,055 ^c
		Dímero B2	0,349 ± 0,025 ^b	0,979 ± 0,048 ^a	Coeluye
	FLAVONOL	Hiperósido	0,047 ± 0,000 ^a	0,032 ± 0,002 ^b	0,046 ± 0,001 ^a
		Rutina	0,029 ± 0,000 ^b	0,027 ± 0,003 ^b	0,048 ± 0,005 ^a
		Quercetina-3-O-glucurónido	1,425 ± 0,001 ^b	1,305 ± 0,077 ^c	0,368 ± 0,012 ^a
		Quercetina-3-O-glucósido	0,106 ± 0,004 ^b	0,107 ± 0,005 ^b	0,167 ± 0,009 ^a
		Quercetina	0,005 ± 0,000 ^b	0,019 ± 0,001 ^a	0,019 ± 0,001 ^a

^{a,b,c} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Para ambos extractos se observó un perfil fenólico idéntico al determinado previamente para el extracto óptimo, a excepción del ácido 3-cumárico, no detectado en el extracto etanólico. De este modo, al igual que sucedía para el óptimo, los compuestos más representativos hallados en el permeado y en el extracto etanólico resultaron ser los flavanoles, principalmente en forma de catequina, epicatequina y dímero B₁. Además de estos, otros compuestos importantes resultaron ser el trans-resveratrol, el ácido gálico, el ácido sirínico y el ácido vainílico.

No obstante, en ambos extractos los compuestos fenólicos identificados mostraron importantes diferencias a nivel cuantitativo con respecto al extracto original. En este sentido, el proceso de ultrafiltración produjo un enriquecimiento de los monómeros en el permeado, donde su contenido, por término general, se duplicó respecto al extracto de partida. Con respecto al extracto etanólico, cabe destacar que el trans-resveratrol, la catequina y el ácido vainílico se encontraron en cantidades notablemente superiores con respecto al óptimo y a su permeado, además de un aumento en el ácido sirínico con respecto al óptimo. Por otro lado, algunos compuestos del extracto etanólico se encontraron en cantidades notablemente inferiores a las de los otros dos extractos, destacando la quercetina-3-O-glucurónido, seguida del ácido caftarico y el ácido 2,3-dihidroxibenzoico.

3.2.3.2. Caracterización funcional.

Con objeto de estudiar las propiedades funcionales del permeado y del extracto etanólico se analizó su TPC, así como su actividad antioxidante.

El contenido en compuestos fenólicos totales del permeado fue de $57,47 \pm 1,93$ mg de GAE/g de extracto, mientras que para el extracto etanólico fue de $87,41 \pm 0,00$ mg de GAE/g de extracto. Como cabría esperar, debido a la pérdida de compuestos fenólicos poliméricos, este valor resultó inferior con respecto al del extracto original (185,33 mg GAE/g de extracto).

La actividad antioxidante del permeado resultó ser de $0,901 \pm 0,006$ mmol de trolox/g de extracto para el método del ABTS y de $0,281 \pm 0,001$ mmol de trolox/g de extracto para el método del DPPH. Por su parte, la actividad antioxidante del extracto etanólico resultó ser de $1,39 \pm 0,02$ mmol de trolox/g de extracto y de $0,29 \pm 0,01$ mmol de trolox/g de extracto, para el ABTS y DPPH, respectivamente.

Al igual que sucedía para el TPC, el valor TEAC de ambos extractos presentó unos valores notablemente inferiores a los determinados para el extracto óptimo. Dichos resultados corroboran los datos obtenidos en el apartado anterior, donde la actividad antioxidante del extracto óptimo se atribuye en parte a la fracción de polímeros fenólicos. De este modo, la reducción en el TPC al eliminarse la fracción polimérica en el permeado explicaría la reducción en la actividad antioxidante del mismo.

3.2.3.3. Biodisponibilidad.

Con la intención de comparar la biodisponibilidad del permeado de raspón y del extracto etanólico con la obtenida para el óptimo, la determinación de dicha biodisponibilidad se llevó a cabo en idénticas condiciones a las ya descritas en el capítulo anterior.

3.2.3.3.1. Digestión *in vitro*.

- Composición fenólica.

La influencia de las distintas etapas del proceso de la digestión sobre el permeado y el extracto etanólico se muestran en la Tabla 21 y Tabla 22, respectivamente.

Los resultados obtenidos indican que, de modo general, el proceso digestivo mostró un patrón similar al que presentaba el extracto óptimo de raspón. Así, durante la etapa bucal no se observaron cambios en la composición fenólica de los extractos, mientras que durante la etapa estomacal e intestinal se produjeron los cambios más significativos.

Del mismo modo, el efecto de este proceso sobre los flavanoles resultó notablemente más intenso que para el resto de compuestos fenólicos. Así, las etapas estomacal e intestinal supusieron pérdidas importantes para todos los flavanoles, aunque los dímeros analizados (B_1 y B_2), parecen resistir mejor el proceso digestivo. En este sentido, cabe destacar que el descenso observado en este grupo resultó, aunque importante, menos acusado en el extracto etanólico que para el extracto óptimo y su permeado.

Con respecto a los flavonoles se observaron pérdidas leves durante la etapa estomacal e intestinal, resultando en general más resistentes al proceso digestivo los derivados de la quercetina que en su forma aglicona. Cabe destacar que durante la digestión del extracto etanólico, la quercetina-3-O-glucósido resultó estable durante dicho proceso.

Tabla 21. Composición fenólica del permeado de raspón durante el proceso digestivo (mg de compuesto/L de extracto).

			EXTRACTO PERMEADO DE RASPÓN			
			Inicial	Bucal	Estomacal	Intestinal
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	29,99 ± 1,32 ^a	32,75 ± 1,67 ^a	21,47 ± 1,64 ^b	21,86 ± 0,27 ^b
		Ácido Protocatéquico	0,59 ± 0,03 ^a	0,62 ± 0,05 ^a	0,57 ± 0,02 ^a	0,52 ± 0,01 ^b
		Monogaloil glucósido	1,29 ± 0,10 ^a	1,38 ± 0,13 ^a	0,66 ± 0,03 ^b	Nd
		Ácido 4-hidroxibenzoico	3,21 ± 0,06 ^a	3,40 ± 0,19 ^a	3,78 ± 0,19 ^b	4,85 ± 0,45 ^c
		Ácido Vainíllico	7,04 ± 1,42 ^a	6,88 ± 0,42 ^a	7,13 ± 0,99 ^a	7,74 ± 1,63 ^a
		Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	1,55 ± 0,12 ^a	1,86 ± 0,13 ^a	Nd	Nd
		Ácido Siríngico	12,49 ± 0,53 ^b	13,76 ± 0,81 ^{a,b}	14,08 ± 0,45 ^a	13,11 ± 0,36 ^{a,b}
		Galato de etilo	0,64 ± 0,03 ^c	0,70 ± 0,03 ^c	0,86 ± 0,14 ^b	1,49 ± 0,25 ^a
		Ácido Elágico	2,33 ± 0,04 ^a	2,48 ± 0,14 ^a	0,39 ± 0,01 ^c	0,61 ± 0,03 ^b
		Aldehído Protocatéquico	0,70 ± 0,04 ^a	0,68 ± 0,03 ^a	0,66 ± 0,10 ^a	Coeluye
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	7,69 ± 0,32 ^a	8,44 ± 0,53 ^a	5,64 ± 0,51 ^b	3,95 ± 0,18 ^c
		Ácido Cafeico	0,23 ± 0,01 ^c	0,25 ± 0,03 ^c	0,61 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,03 ^b
		Ácido p-Cumárico	Coeluye	Coeluye	Coeluye	Coeluye
		Ácido 3-Cumárico	0,25 ± 0,04 ^{a,b}	0,29 ± 0,04 ^a	0,14 ± 0,02 ^c	0,18 ± 0,04 ^{b,c}
		Ácido Ferúlico	0,52 ± 0,05 ^a	0,53 ± 0,04 ^a	0,47 ± 0,02 ^a	0,40 ± 0,03 ^b
	ESTILBENOS	trans-Piceido	0,82 ± 0,00 ^a	0,85 ± 0,05 ^a	0,85 ± 0,01 ^a	0,85 ± 0,00 ^a
		trans-Resveratrol	13,91 ± 0,60 ^b	15,22 ± 0,86 ^a	13,83 ± 0,33 ^b	11,89 ± 0,04 ^c
FLAVONIODES	FLAVANOLES	Catequina	137,86 ± 7,13 ^a	150,09 ± 10,2 ^a	64,69 ± 2,33 ^b	9,86 ± 1,27 ^c
		Epicatequina	79,58 ± 4,36 ^a	84,00 ± 6,67 ^a	29,76 ± 2,88 ^b	15,44 ± 1,81 ^c
		Galato de epicatequina	12,82 ± 1,24 ^a	13,85 ± 0,82 ^a	3,29 ± 0,23 ^b	2,29 ± 0,19 ^c
		Dímero B1	47,42 ± 1,69 ^a	52,19 ± 3,26 ^a	37,50 ± 0,08 ^b	24,94 ± 1,56 ^c
		Dímero B2	29,36 ± 1,44 ^a	29,13 ± 0,91 ^a	24,81 ± 0,63 ^b	18,74 ± 2,54 ^c
	FLAVONOLES	Hiperósido	0,97 ± 0,06 ^a	1,09 ± 0,08 ^a	0,53 ± 0,11 ^b	0,39 ± 0,08 ^c
		Rutina	0,82 ± 0,10 ^a	0,92 ± 0,05 ^a	0,72 ± 0,05 ^b	0,48 ± 0,07 ^c
		Quercetina-3-O-glucurónido	39,15 ± 2,32 ^a	42,91 ± 2,77 ^a	30,14 ± 1,22 ^b	23,60 ± 2,03 ^c
		Quercetina-3-O-glucósido	3,20 ± 0,14 ^{a,b}	3,61 ± 0,17 ^a	2,46 ± 0,13 ^c	2,72 ± 0,71 ^{b,c}
		Quercetina	0,56 ± 0,03 ^a	0,60 ± 0,02 ^a	Nd	Nd

^{a,b,c,d} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Tabla 22. Composición fenólica del extracto etanólico de raspón durante el proceso digestivo (mg de compuesto / L de extracto).

			EXTRACTO ETANÓLICO DE RASPÓN			
			Inicial	Bucal	Estomacal	Intestinal
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	21,79 ± 1,13 ^{a,b}	22,06 ± 1,25 ^{a,b}	23,64 ± 1,00 ^a	20,12 ± 1,42 ^b
		Ácido Protocatéquico	0,52 ± 0,05 ^a	0,52 ± 0,01 ^a	0,56 ± 0,01 ^a	0,50 ± 0,02 ^a
		Monogaloil glucósido	0,15 ± 0,07 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	Nd	Nd
		Ácido 4-hidroxibenzoico	5,18 ± 0,34 ^b	5,46 ± 0,28 ^{a,b}	5,03 ± 0,03 ^b	5,82 ± 0,13 ^a
		Ácido Vainílico	15,14 ± 0,47 ^a	14,79 ± 0,36 ^a	Coeluye	Coeluye
		Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	0,75 ± 0,12 ^a	0,81 ± 0,13 ^a	Nd	Nd
		Ácido Siríngico	14,68 ± 0,61 ^b	16,04 ± 0,55 ^a	15,22 ± 0,07 ^{a,b}	14,54 ± 0,87 ^b
		Galato de etilo	0,44 ± 0,06 ^c	0,43 ± 0,04 ^c	0,57 ± 0,01 ^b	0,64 ± 0,06 ^a
		Ácido Elágico	3,92 ± 0,20 ^a	3,90 ± 0,26 ^a	0,36 ± 0,01 ^c	1,04 ± 0,15 ^b
		Aldehído Protocatéquico	Coeluye	Coeluye	Coeluye	Coeluye
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	0,55 ± 0,03 ^a	0,55 ± 0,02 ^a	0,56 ± 0,00 ^a	0,55 ± 0,05 ^a
		Ácido Cafeico	0,44 ± 0,08 ^a	0,53 ± 0,04 ^a	0,37 ± 0,01 ^b	0,34 ± 0,05 ^b
		Ácido p-Cumárico	0,26 ± 0,02 ^b	0,44 ± 0,02 ^a	Coeluye	Coeluye
		Ácido Ferúlico	Coeluye	Coeluye	Coeluye	Coeluye
	ESTILBENOS					
		trans-Piceido	1,46 ± 0,07 ^a	1,50 ± 0,08 ^a	1,40 ± 0,01 ^a	1,24 ± 0,07 ^b
		trans-Resveratrol	36,45 ± 1,07 ^b	40,99 ± 3,62 ^{a,b}	42,45 ± 1,04 ^a	44,98 ± 3,47 ^a
FLAVONOIDES	FLAVANOLES	Catequina	199,87 ± 11,4 ^a	208,62 ± 11,5 ^a	112,62 ± 0,12 ^b	63,05 ± 1,39 ^c
		Epicatequina	43,05 ± 2,20 ^a	44,35 ± 0,24 ^a	36,00 ± 0,24 ^b	21,53 ± 1,81 ^c
		Galato de epicatequina	13,98 ± 0,27 ^a	14,71 ± 0,66 ^a	Trazas ^c	1,92 ± 0,10 ^b
		Dímero B1	30,85 ± 1,64 ^b	26,74 ± 2,28 ^b	36,03 ± 0,20 ^a	21,59 ± 2,84 ^c
		Dímero B2	Coeluye	Coeluye	Coeluye	Coeluye
	FLAVONOLES	Hiperósido	1,37 ± 0,04 ^a	1,39 ± 0,12 ^a	0,54 ± 0,01 ^c	0,79 ± 0,04 ^b
		Rutina	1,43 ± 0,14 ^a	1,40 ± 0,25 ^a	0,82 ± 0,02 ^c	1,07 ± 0,01 ^b
		Quercetina-3-O-glucurónido	11,58 ± 0,37 ^a	12,07 ± 0,05 ^a	7,30 ± 0,06 ^c	8,62 ± 0,40 ^b
		Quercetina-3-O-glucósido	5,01 ± 0,26 ^a	4,88 ± 0,19 ^a	5,00 ± 0,03 ^a	4,88 ± 0,16 ^a
		Quercetina	0,27 ± 0,01 ^a	0,29 ± 0,05 ^a	0,04 ± 0,00 ^c	0,10 ± 0,01 ^b

^{a,b,c,d} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

- Actividad antioxidante.

La influencia de las distintas etapas del proceso digestivo sobre la actividad antioxidante del permeado de raspón y del extracto etanólico se muestra en la Figura 40. Los resultados indican que la actividad antioxidante del permeado no sufre cambios significativos durante el proceso de la digestión. Igualmente, el proceso de la digestión

no mostró cambios en la actividad antioxidante del extracto etanólico, manteniéndose constante en cada una de las etapas de la digestión.

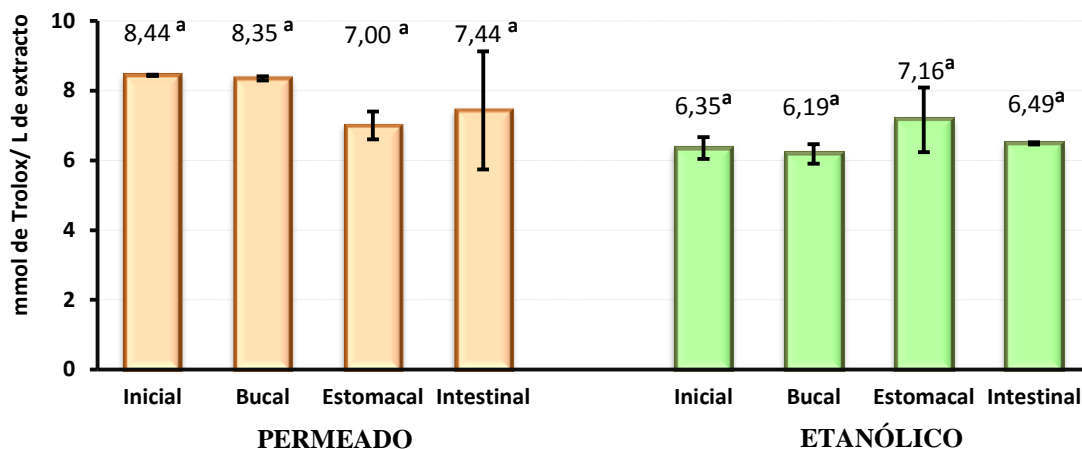


Figura 40. Valor TEAC del permeado de raspón y del extracto etanólico durante el proceso digestivo.

^a Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Del mismo modo, cuando se analizó el TPC de los extractos tras el proceso de la digestión, los resultados no mostraron pérdidas de dichos compuestos en ninguno de los extractos (Figura 41).

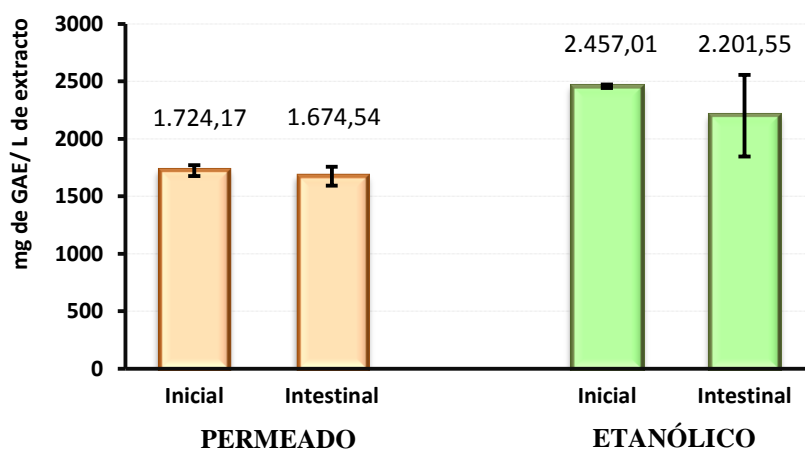


Figura 41. TPC al inicio y final del proceso digestivo.

Estos resultados se diferencian de los obtenidos previamente para el extracto óptimo, ya que la actividad antioxidante del extracto óptimo disminuía considerablemente tras la digestión estomacal, relacionándose dicho descenso con la importante pérdida en compuestos fenólicos poliméricos que se observaba a lo largo del proceso digestivo. Así, los datos obtenidos con el permeado y el extracto etanólico vienen a confirmar ese supuesto, ya que en ambos casos, al tener una cantidad muy baja de compuestos poliméricos su actividad antioxidante se mantiene constante durante el proceso digestivo.

3.2.3.3.2. Absorción intestinal.

- Composición fenólica.

Los resultados del proceso de absorción intestinal sobre la composición fenólica se muestran en la Tabla 23 para el permeado de raspón y en la Tabla 24 para el etanólico.

Estos datos indican que la composición fenólica de la fracción biodisponible del permeado se asemeja, de modo general, a la obtenida para el extracto óptimo de raspón. Así, los compuestos fenólicos que tuvieron mayor representación en esta fracción fueron de nuevo la catequina y los ácidos hidroxibenzoicos. Otro compuesto con una ratio de absorción intestinal importante resultó ser el resveratrol en forma de metabolito (38 %).

Sin embargo, la fracción biodisponible del extracto etanólico presentó importantes diferencias respecto a la obtenida para el extracto óptimo y el permeado. Dichas diferencias se basan no tanto en los compuestos presentes en la fracción biodisponible como en su cantidad. Así, los compuestos mayoritarios de esta fracción siguen siendo la catequina, los ácidos hidroxibenzoicos y el resveratrol, aunque también hay que destacar la presencia en la fracción biodisponible de epicatequina y dímero B₁ y de ciertas cantidades de quercetina en forma de glucurónido y glucósido.

Al comparar los resultados obtenidos tras el proceso digestivo para el permeado de raspón con respecto al extracto original, se observó que en general, el digerido del permeado presentaba tan solo cantidades ligeramente superiores de los compuestos estudiados, a pesar de contener en origen prácticamente el doble de compuestos oligómeros. Por ello, el perfil fenólico observado para la fracción biodisponible del permeado resulta similar al determinado para el extracto óptimo.

Estos resultados se pueden explicar porque, tanto en origen como en el digerido, la cantidad de estos compuestos en el extracto etanólico resulta notablemente superior a la determinada para el extracto óptimo y su permeado, existiendo por tanto, la absorción de una mayor cantidad de dichos compuestos, o porque la matriz de partida influye de manera decisiva en la absorción intestinal de dichos compuestos.

Tabla 23. Absorción intestinal de los compuestos fenólicos presentes en la fase intestinal (mg de compuesto / L de extracto).

		EXTRACTO PERMEADO DE RASPÓN			
			Digerido	Apical	Basolateral
ÁCIDOS FENÓLICO	BENZOICOS	Ácido Gálico	21,86 ± 0,27	7,75 ± 0,27	0,78 ± 0,05
		Ácido Protocatéquico	0,52 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,07 ± 0,01
		Monogaloil glucósido	Nd	Nd	Nd
		Ácido 4-hidroxibenzoico	4,85 ± 0,45	3,96 ± 0,14	1,21 ± 0,07
		Ácido Vainfílico	7,74 ± 1,63	Coeluye	6,03 ± 0,14
		Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	Nd	Nd	Nd
		Ácido Siríngico	13,11 ± 0,36	8,12 ± 0,11	3,07 ± 0,23
		Galato de etilo	1,49 ± 0,25	0,37 ± 0,08	Nd
		Ácido Elágico	0,61 ± 0,03	0,40 ± 0,03	Nd
		Aldehído Protocatéquico	Coeluye	Coeluye	0,41 ± 0,01
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	3,95 ± 0,18	1,93 ± 0,11	0,46 ± 0,02
		Ácido Cafeico	0,36 ± 0,03	Nd	Nd
		Ácido p-Cumárico	Coeluye	0,37 ± 0,02	0,16 ± 0,00
		Ácido 3-Cumárico	0,18 ± 0,04	Nd	Nd
		Ácido Ferúlico	0,40 ± 0,03	Nd	0,34 ± 0,01
	ESTILBENOS	trans-Piceido	0,85 ± 0,00	0,54 ± 0,01	0,10 ± 0,00
		trans-Resveratrol	11,89 ± 0,04	0,26 ± 0,02	1,14 ± 0,03
		Metabolito de Resveratrol	Nd	4,73 ± 0,05	4,47 ± 0,14
FLAVONIODES	FLAVANOLES	Catequina	9,86 ± 1,27	Coeluye	6,05 ± 0,26
		Epicatequina	15,44 ± 1,81	4,23 ± 1.00	Trazas
		Galato de epicatequina	2,29 ± 0,19	Nd	Nd
		Dímero B1	4,94 ± 1,56	Nd	Nd
		Dímero B2	18,74 ± 2,54	Trazas	Nd
	FLAVONOLES	Hiperósido	0,39 ± 0,08	0,15 ± 0,02	Nd
		Rutina	0,48 ± 0,07	Trazas	Nd
		Quercetina-3-O-glucurónido	23,60 ± 2,03	11,72 ± 0,29	0,89 ± 0,02
		Quercetina-3-O-glucósido	2,72 ± 0,71	2,25 ± 0,08	Trazas
		Quercetina	Trazas	Nd	Nd

Tabla 24. Absorción intestinal de los compuestos fenólicos presentes en la fase intestinal (mg de compuesto / L de extracto).

			EXTRACTO ETANÓLICO DE RASPÓN		
			Digerido	Apical	Basolateral
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	20,12 ± 1,42	8,38 ± 0,04	3,96 ± 0,24
		Ácido Protocatéquico	0,50 ± 0,02	Coeluye	0,33 ± 0,02
		Monogaloil glucósido	Nd	Nd	Nd
		Ácido 4-hidroxibenzoico	5,82 ± 0,13	2,45 ± 0,10	3,67 ± 0,37
		Ácido Vainíllico	Coeluye	Coeluye	9,04 ± 0,5
		Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	Nd	Nd	Nd
		Ácido Siríngico	14,54 ± 0,87	10,34 ± 0,78	6,55 ± 0,39
		Galato de etilo	0,64 ± 0,06	0,30 ± 0,08	0,11 ± 0,00
		Ácido Elágico	1,04 ± 0,15	0,39 ± 0,01	Nd
		Aldehído Protocatéquico	Coeluye	Coeluye	0,41 ± 0,01
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	0,55 ± 0,05	Trazas	Trazas
		Ácido Cafeico	0,34 ± 0,05	Trazas	0,12 ± 0,02
		Ácido p-Cumárico	Coeluye	Coeluye	0,24 ± 0,03
		Ácido Ferúlico	Coeluye	Coeluye	0,59 ± 0,08
	ESTILBENOS	trans-Piceido	1,24 ± 0,07	0,89 ± 0,01	0,33 ± 0,03
		trans-Resveratrol	44,98 ± 3,47	6,34 ± 0,15	9,75 ± 0,31
		Metabolito de Resveratrol	Nd	2,04 ± 0,02	2,86 ± 0,17
FLAVONOIDES	FLAVANOLES	Catequina	63,05 ± 1,39	37,47 ± 1,93	20,64 ± 0,17
		Epicatequina	21,53 ± 1,81	9,91 ± 1,80	5,23 ± 0,29
		Galato de epicatequina	1,92 ± 0,10	Nd	Nd
		Dímero B1	21,59 ± 2,84	3,80 ± 0,56	2,49 ± 0,05
		Dímero B2	Coeluye	Nd	Nd
	FLAVONOLES	Hiperósido	0,79 ± 0,04	0,55 ± 0,02	0,05 ± 0,01
		Rutina	1,07 ± 0,01	0,76 ± 0,04	Nd
		Quercetina-3-O-glucurónido	8,62 ± 0,40	7,13 ± 0,16	1,68 ± 0,24
		Quercetina-3-O-glucósido	4,88 ± 0,16	1,84 ± 0,08	1,41 ± 0,07
		Quercetina	0,10 ± 0,01	0,02 ± 0,00	Trazas

- Actividad antioxidante.

La actividad antioxidante tras el proceso de absorción intestinal para los dos extractos estudiados se muestra en la Figura 42. Así, la actividad antioxidante de la fracción biodisponible procedente del extracto etanólico mostró un valor de $1,2 \pm 0,27$ mmol de trolox/L de extracto, mientras que la del permeado presentó un valor de $0,48 \pm 0,005$ mmol de trolox/L de extracto.

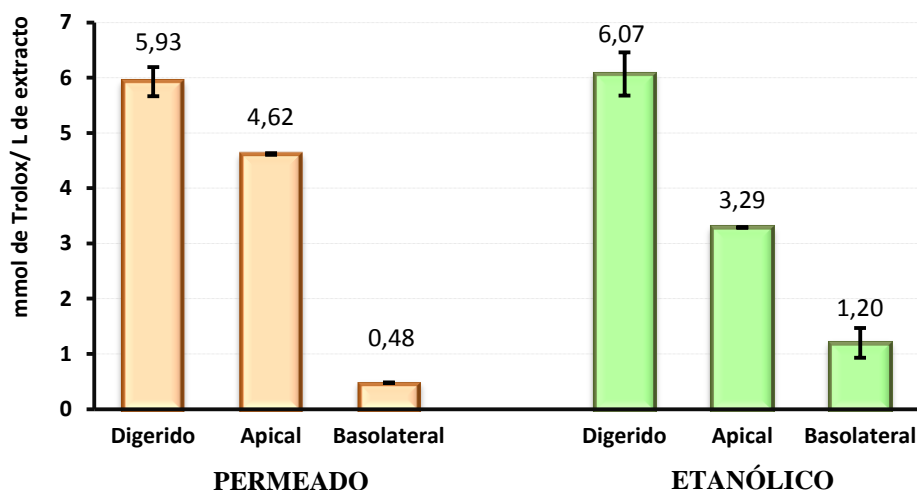


Figura 42. Valor TEAC en la fracción biodisponible tras seis horas de absorción intestinal.

Además, en la fracción biodisponible del permeado se observó aproximadamente un 13 % del TPC presente en el digerido, con un valor equivalente a 144,5 mg GAE/L de extracto. Por su parte, el TPC de la fracción biodisponible del extracto etanólico resultó ser de 489,11 mg de GAE/L de extracto, correspondiendo a un 26 % del valor del extracto digerido (Figura 43).

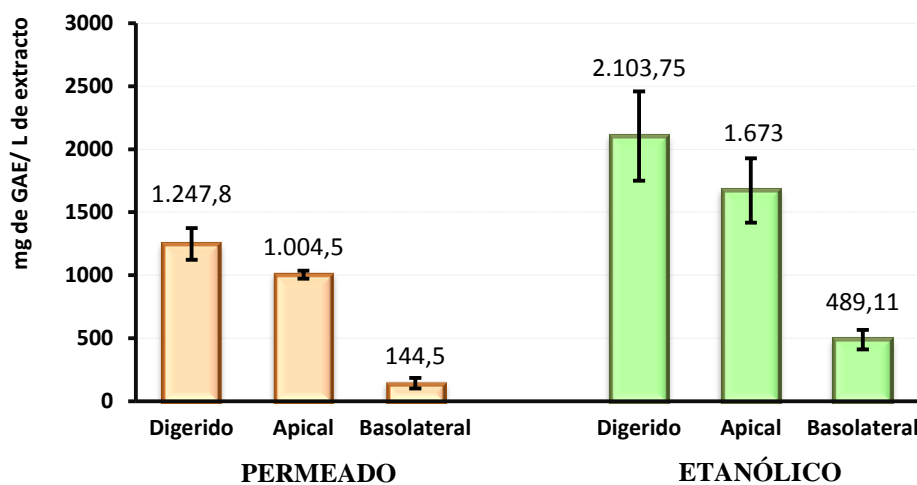


Figura 43. TPC en la fracción biodisponible tras seis horas de absorción intestinal.

Cabe destacar que no se observaron diferencias entre el TPC de la fracción biodisponible del permeado con respecto al extracto óptimo (110,4 mg GAE/L de extracto), así como en el valor TEAC de dicha fracción (0,46 mmol de trolox/L de extracto). Por el contrario, dicho valor fue notablemente superior en la fracción biodisponible del extracto etanólico.

De este modo, a pesar de que el proceso de filtración consiguió incrementar la cantidad de compuestos monoméricos en el permeado, tras el proceso digestivo tan solo

permaneció una cantidad ligeramente superior de ellos con respecto al extracto óptimo de raspón. Este hecho se traduce, por tanto, en una absorción de compuestos fenólicos similar para ambos extractos. Por tanto, se puede concluir que el proceso de filtración no fue capaz de incrementar el contenido de compuestos fenólicos en la fracción biodisponible ni su actividad antioxidante con respecto al extracto óptimo de raspón.

Sin embargo, en la fracción biodisponible del extracto etanólico la cantidad de los compuestos estudiados es muy superior lo que indicaría que la matriz de partida influye en la absorción de estos compuestos.

En consecuencia, a la hora de escoger extractos para el desarrollo de alimentos enriquecidos en compuestos fenólicos, sería imprescindible realizar este tipo de ensayos como paso previo a la elección del extracto.

3.3. Pepitas.

3.3.1. Extracción PLE de pepitas.

Una vez analizado el raspón como fuente de compuestos fenólicos biodisponibles se estimó oportuno realizar el análisis de las pepitas con el mismo fin. De esta manera, se llevó a cabo un diseño experimental con PLE de las mismas características que el descrito para el raspón (Tabla 25).

Tabla 25. Matriz del diseño experimental compuesto central rotatorio empleado para la obtención de extractos PLE de pepitas.

Exp	Et (%)	T (°C)	t (min)
1	20	36	3
2	80	36	3
3	20	84	3
4	80	84	3
5	20	36	9
6	80	36	9
7	20	84	9
8	80	84	9
9	0	60	6
10	100	60	6
11	50	20	6
12	50	100	6
13	50	60	1
14	50	60	11
15	50	60	6
16	50	60	6
17	50	60	6
18	50	60	6
19	50	60	6

A diferencia del diseño experimental realizado para el raspón, para este diseño la temperatura de extracción se llevó sólo hasta los 100 °C. Esta reducción en el intervalo de temperaturas se aplicó como consecuencia de que, a pesar de haberse desgrasado las pepitas previamente a su extracción, datos experimentales previos sugerían una degradación de compuestos al superar dicha temperatura (100 °C) (datos no mostrados). Por ello, el intervalo de temperaturas estudiadas se fijó de 20 °C a 100 °C. En este sentido, Piñeiro y col. (2004), observaron cómo temperaturas superiores a 100°C provocaban una degradación de catequinas, acentuándose dicho proceso cuando la temperatura superó los 130°C.

En la Tabla 26 se muestra que las variables de respuesta estudiadas fueron las mismas que en el estudio del raspón, con la salvedad de la determinación del valor TEAC mediante el método del radical DPPH. Como ya se puso de manifiesto en el apartado anterior (4.2. Raspón), los resultados obtenidos por ambas metodologías de actividad antioxidante (ABTS y DPPH) fueron muy similares; por tanto, se decidió aplicar un solo método para determinar la actividad antioxidante de los extractos.

Tabla 26. Matriz del diseño experimental, indicando los valores experimentales obtenidos para las diferentes variables respuesta.

Exp	Rendimiento	TPC	ABTS	Mono- y oligómeros	Polímeros metanol	Polímeros agua	Polímeros totales
	(g extracto/ 100 g pepitas)	(mg GAE/ g extracto)	(mmol trolox/ g extracto)	(mg catequina/ g extracto)			
1	21,68	269,14	7,56	132,12	267,70	46,45	446,27
2	21,5	238,44	7,30	135,61	272,77	42,90	451,29
3	26,46	297,89	8,05	63,47	154,32	19,59	237,39
4	24,72	279,19	7,87	139,11	311,34	48,21	498,67
5	24,48	263,00	7,75	144,67	273,22	47,06	464,95
6	21,78	297,89	8,05	127,54	326,63	54,13	508,30
7	27,5	205,23	6,47	66,52	162,55	25,04	254,11
8	24,84	286,17	7,96	143,86	240,64	33,59	418,10
9	23,14	230,91	7,05	128,67	232,05	30,49	391,22
10	21,12	255,75	7,41	65,91	242,36	36,54	344,82
11	22,36	310,17	8,29	131,14	305,33	62,18	498,65
12	30,74	281,70	7,87	74,00	235,78	33,26	343,04
13	23,48	304,31	8,17	134,96	283,79	54,91	473,66
14	23,26	323,01	8,49	140,01	285,07	53,94	479,03
15	25,62	308,22	8,20	95,88	274,16	49,01	419,05
16	23,18	314,64	8,50	134,93	276,96	48,16	460,06
17	24,26	297,05	8,01	137,80	280,99	49,26	468,06
18	22,32	308,78	8,22	131,68	276,45	53,31	461,05
19	23,44	295,94	7,93	134,62	225,56	37,07	397,26

3.3.1.1. Rendimiento, TPC, valor TEAC

El análisis estadístico de los datos obtenidos respecto a estas tres variables respuesta (rendimiento, TPC y valor TEAC) indicó que, en todos los casos, estos se ajustaban al modelo de regresión lineal cuadrática propuesto, explicando del 85 al 93% de dichos datos. A diferencia de lo que ocurría en el diseño del raspón en este caso el comportamiento del rendimiento fue diferente al mostrado por el TPC y el valor TEAC. De esta manera, la temperatura de extracción fue el factor que ejerció una mayor influencia sobre el rendimiento, mientras que la composición del disolvente mostró un

efecto moderado (Tabla 27). En este sentido, el rendimiento variaba de manera cuadrática respecto a la temperatura, mientras que el etanol provocó un incremento lineal; de tal manera que el rendimiento aumentó al incrementarse la temperatura y al disminuir el porcentaje de agua utilizado.

Tabla 27. Ecuaciones de regresión, coeficientes de las variables respuesta, condiciones óptimas de extracción y valor óptimo derivados del diseño de las pepitas.

	<i>Ecuación de regresión</i>	<i>R</i>	<i>Condiciones óptimas (% Et; °C; min)</i>	<i>Valor óptimo</i>
Rendimiento (%)	$Y = 26,2984 - 0,0263927(Et) - 0,14602(T) + 0,00194226(T)^2$	0,909	0/100/ 10,6	31,07
TPC (mg GAE/g de extracto)	$Y = 159,929 + 1,71911(Et) + 2,88061(T) + 3,08083(t) - 0,0286387(Et)^2 + 0,235371(Et \times t) + 0,0116306(T)^2 - 0,24749(T \times t)$	0,932	75/20/10,6	354,02
ABTS (mmol de trolox/g)	$Y = 6,44972 + 0,0235014(Et) + 0,0259616(T) + 0,100783(t) - 0,000425612(Et)^2 + 0,00317664(Et \times t) - 0,00432693(T \times t)$	0,848	30/100/1	9,11
Polímeros (metanol)	$Y = 387,285 - 1,11844(Et) - 2,77271(T) + 0,0314506(Et \times T)$	0,785	0,18/20/9	331,34
Polímeros (agua)	$Y = 51,3362 + 0,695035(Et) - 0,348373(T) - 0,00695035(Et)^2$	0,796	50/20/6	61,69
Polímeros Totales	$Y = 421,636 + 0,876772(Et) - 3,4206(T) - 0,0222893(Et)^2 + 0,037441(Et \times T)$	0,843	37/20/7	382,57

García-Mariano y col., (2006) describieron que durante extracciones PLE con agua a partir de pepitas de uva Tempranillo, la temperatura ejerce un efecto importante en el rendimiento, incrementándose conforme aumenta dicho factor. De este modo, coincidiendo con este último estudio, el rendimiento de extracción máximo se alcanzaría con las temperaturas de extracción máximas. Sin embargo, para las condiciones óptimas de este estudio se estima un valor teórico de 31,07 % (100 % agua, 100 °C, 11 minutos), que resulta notablemente superior al determinado por estos autores (12,4 %), que podría estar relacionado con las características de la matriz seleccionada para nuestro estudio (variedad, condiciones edafoclimáticas, etc.).

Sin embargo el comportamiento del TPC y del valor TEAC mostró grandes diferencias respecto a del rendimiento, aunque, en líneas generales, fue similar entre sí. En este sentido, el etanol fue la variable que ejerció una mayor influencia, afectando de manera cuadrática, mientras que el efecto de la temperatura fue más moderado. Asimismo, se encontraron interacciones entre los tres factores estudiados que influyeron en los resultados obtenidos. A modo de ejemplo en la Figura 44 se muestra el diagrama de

Pareto (Figura 44a) y las superficies de respuesta obtenidas para el TPC (Figuras 44b, 44c y 44d).

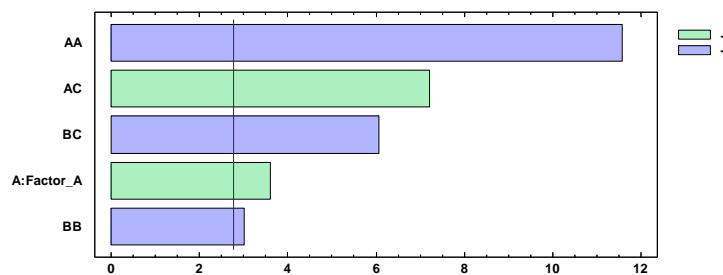


Figura 44a

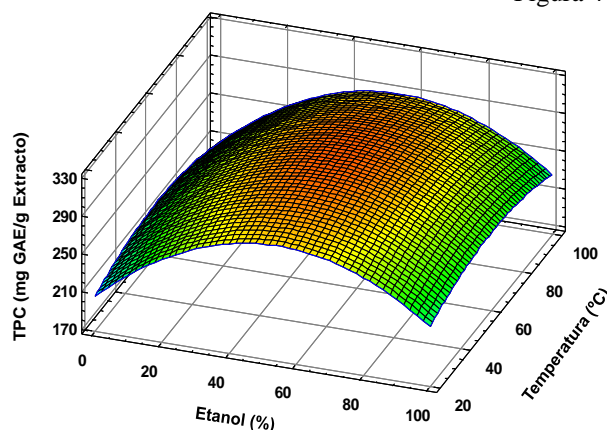


Figura 44b

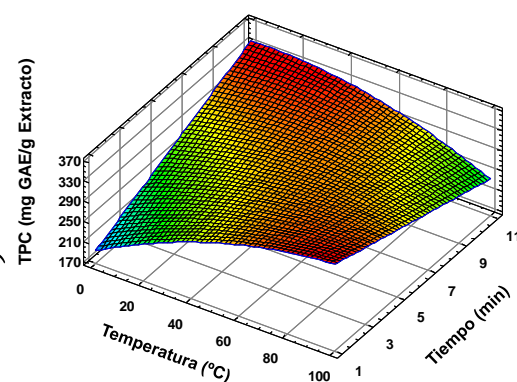


Figura 44c

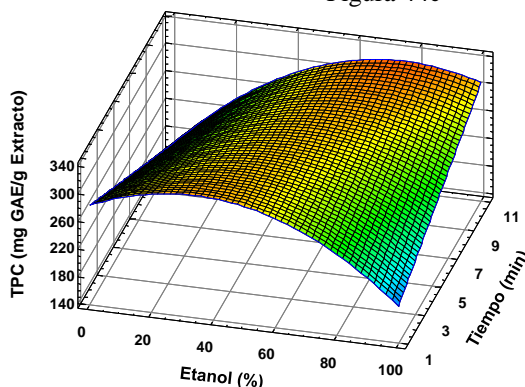


Figura 44d

Figura 44. Diagrama de Pareto (a) y superficies de respuesta ($t = 6$) (b), ($Et = 50$) (c) y ($T = 60$) (d) para la actividad antioxidante por el método del ABTS.

Tal y como se mostró anteriormente para el raspón, las mezclas de agua y etanol producen extractos con un TPC y por ende con una actividad antioxidante mayor que las realizadas con sólo uno de estos disolventes. En este sentido, coincidiendo con este estudio, Li y col., (2011) encontraron que la composición en etanol del solvente de extracción a partir de pepitas fue el factor que ejercía un mayor efecto, de manera cuadrática, sobre el TPC de los extractos. Asimismo, observaron que al incrementar la temperatura de extracción para este tipo de matrices se hace necesario un menor contenido de etanol en el disolvente de extracción, puesto que con menores contenidos

se aumenta teóricamente la extracción de las proantocianidinas (Bucić-Kojić y col., 2009; Makris y col., 2011).

3.3.1.2. Oligómeros y polímeros.

El estudio de la influencia de los factores experimentales sobre el perfil fenólico de los extractos, según su grado de polimerización, se llevó a cabo mediante un análisis de HPLC-NP, tal y como se comentó previamente en el apartado del raspón.

- Oligómeros

Los resultados del análisis estadístico para el contenido de oligómeros en los extractos se muestran en la Figura 45.

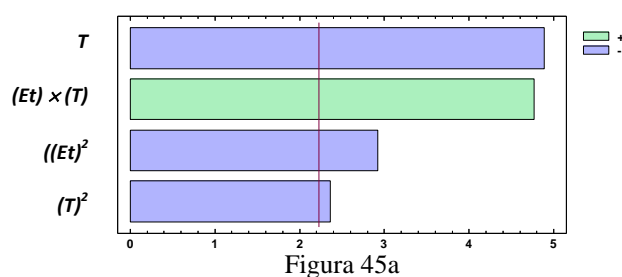


Figura 45a

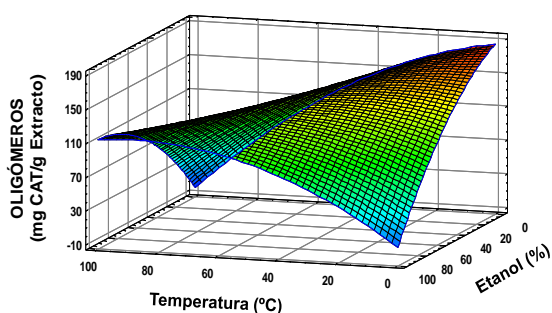


Figura 45b

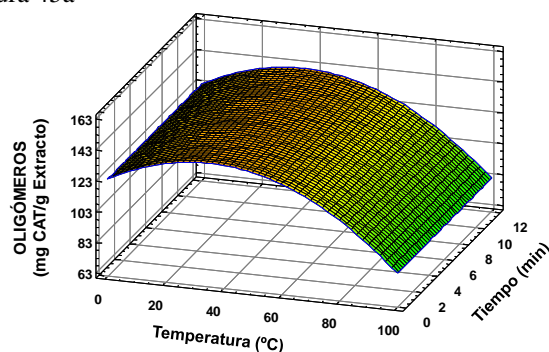


Figura 45c

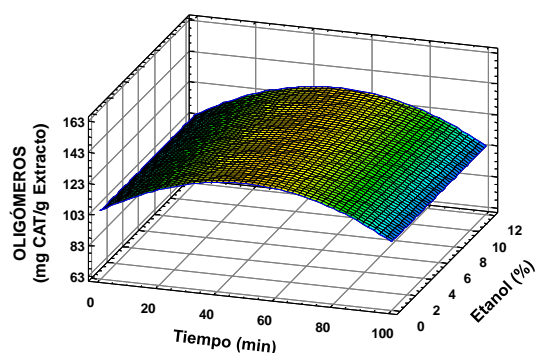


Figura 45d

Figura 45. Diagrama de Pareto (a) y superficies de respuesta ($t = 6$) (b), ($Et = 50$) (c) y ($T = 60$) (d) para el contenido en oligómeros.

Si bien el análisis estadístico de los datos experimentales relativos al contenido de oligómeros reveló que dichos datos no se ajustaban al modelo propuesto, del diagrama de Pareto (Figura 45a) puede deducirse que tan sólo la temperatura y la composición del solvente influían en la extracción de estos compuestos. En este sentido, la temperatura fue el factor que ejerció una mayor influencia, así como su interacción con el solvente de extracción, de tal manera que ambos factores no pueden ser considerados aisladamente (Figuras 45b, c y d). De este modo, los extractos con mayores contenidos en oligómeros se obtendrían a temperaturas de 20 °C en ausencia de etanol durante 11 minutos.

- Polímeros

En la Tabla 26 se presenta el contenido de los extractos de pepitas en polímeros solubles en metanol y solubles en agua, así como el contenido total de los mismos. Los datos obtenidos para los polímeros solubles en metanol se ajustaron al modelo propuesto, con un $R = 0,7852$. Tal y como se observa en el diagrama de Pareto, tan sólo la temperatura y la composición del disolvente de extracción resultaron ser factores significativos, junto con una ligera interacción entre ambos factores (Figura 46a). En este sentido, la temperatura resultó ser el factor más determinante con un efecto lineal inverso sobre el contenido en polímeros solubles en metanol, seguido en menor medida por la composición del solvente, los cuales aumentan con el incremento de etanol (Figuras 46a, b y c).

Del mismo modo, los resultados obtenidos para los polímeros solubles en agua y los polímeros totales se ajustaron al modelo propuesto, con un $R = 0,7962$ y un $R = 0,8434$ respectivamente. Ambos mostraron los mismos efectos principales que los encontrados para los polímeros de metanol, siendo por tanto la temperatura el factor principal seguido en menor medida de la composición del solvente (datos no mostrados). De esta manera, los datos se ajustaron a las ecuaciones de regresión cuadrática que se muestran en la Tabla 26.

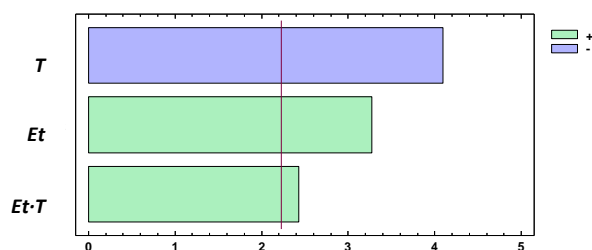


Figura 46a

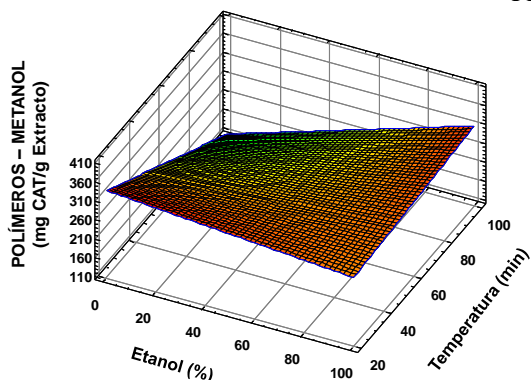


Figura 46c

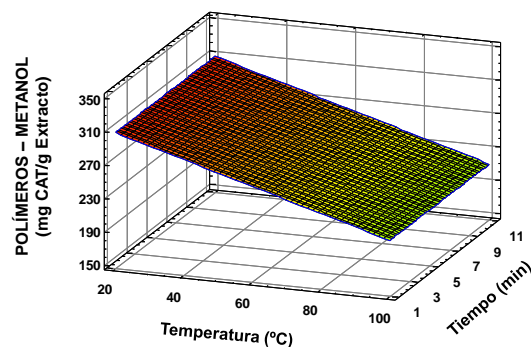


Figura 46b

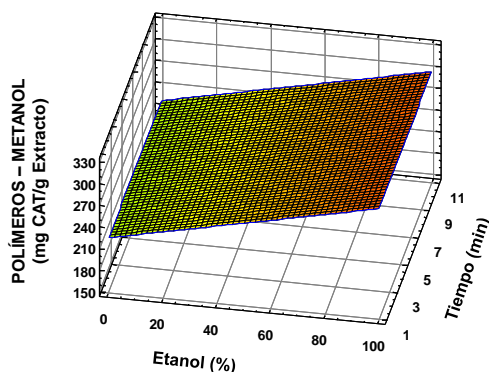


Figura 46d

Figura 46. Diagrama de Pareto (a) y superficies de respuesta ($t = 6$) (b), ($Et = 50$) (c) y ($T = 60$) (d) para el contenido de polímeros solubles en metanol.

Con respecto a la extracción de los polímeros fenólicos, los datos obtenidos coinciden con los mostrados por Makris y col. (2011), quienes pusieron de manifiesto que para maximizar la extracción de este tipo de compuestos era preciso una composición de etanol en el solvente de extracción del 44 % al 53 %. Respecto a la influencia de la temperatura, su efecto no es claro, puesto que mientras unos estudios apuntan al uso de temperaturas moderadas, otros apuntan en sentido contrario (Bucić-Kojić y col., 2009; Makris y col., 2011).

A partir de las ecuaciones mostradas en la Tabla 27 se pueden predecir las condiciones óptimas de extracción en las que se obtendría la mayor cantidad de compuestos poliméricos de cada tipo y totales. De este modo, el contenido máximo de polímeros

solubles en metanol se obtendría en las condiciones de 0 % de etanol, 20 °C y 9 minutos, donde se predice un valor de 331,34 mg de catequina/g de extracto. Sin embargo, las condiciones óptimas para los polímeros solubles en agua resultaron ser 50 % de etanol, 20 °C y 6 minutos, con un valor de predicción de 61,69 mg de catequina/ g de extracto. De este modo, el mayor contenido en compuestos fenólicos poliméricos totales sería de 382,57 mg de catequina/g de extracto, que se obtendría a partir de una extracción correspondiente al 37 % de etanol, 20 °C y 7 minutos.

3.3.1.3. Correlación entre variables dependientes.

Al establecer una relación entre el contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos y su actividad antioxidante se puede observar una buena correlación entre ambos parámetros ($R = 0,983$), tal como se indicó previamente que sucede para los extractos del apartado del raspón.

Asimismo, en la Tabla 28 se indica la correlación que existe entre el TPC y la actividad antioxidante de los extractos y las distintas fracciones fenólicas de las que se componen.

Figura 28. Coeficientes de correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los extractos de pepitas.

	<i>Oligómeros</i>	<i>Polímeros (metanol)</i>	<i>Polímeros (agua)</i>	<i>Polímeros totales</i>	<i>ABTS</i>	<i>TPC</i>
ABTS	0,377	0,517*	0,597**	0,540*	1,000	0,983**
TPC	0,311	0,456*	0,573*	0,486*	0,983**	1,000

* ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

Tal y como puede observarse, los compuestos fenólicos poliméricos, tanto de metanol como de agua, muestran una correlación estadísticamente significativa respecto al TPC y al valor TEAC. De esta forma se puede prever que son los constituyentes mayoritarios de los extractos, además de ser los principales responsables de su actividad antioxidante.

Diversos estudios ponen de manifiesto que la fracción fenólica constituida por polímeros de proantocianidinas es la mayoritaria, respecto a la composición general de los extractos de pepitas, suponiendo del 60 al 85% del total de compuestos fenólicos (Sun y col., 2001; Prodanov y col., 2013). Asimismo, diversos autores apuntan a este tipo de compuestos como los principales responsables de la actividad antioxidante

(Spranger y col., 2008; Bucić-Kojić y col., 2009). En este sentido, de Sá y col., (2013) mostraron una excelente correlación de la actividad antioxidante con las proantocianidinas poliméricas y en menor medida con las oligoméricas, mientras que para los monómeros dicha correlación resultó notablemente inferior.

3.3.2. Caracterización del extracto óptimo de pepitas.

Como se comentó con anterioridad, para obtener la mayor actividad antioxidante las condiciones de extracción óptimas se determinaron en un 30 % de etanol a 100 °C durante 1 minuto, mientras que para la obtención del mayor TPC estas fueron 75 % de etanol, 20 °C y 10,6 minutos. Sin embargo, para ambas variables puede observarse en sus curvas de superficie, la existencia de otras condiciones que permiten la obtención de resultados, respecto a valor TEAC y TPC, prácticamente iguales a los de las condiciones óptimas (Figura 44). Además, estas nuevas condiciones de extracción para el valor TEAC coinciden con las determinadas para el óptimo del TPC, y viceversa. De este modo, el valor TEAC o el TPC obtenido en las condiciones de estos segundos máximos resultaría en un valor muy próximo al determinado para sus condiciones óptimas.

Así, una vez conocida la influencia de los tres factores estudiados durante las extracciones PLE a partir de pepitas sobre la actividad antioxidante y el TPC, y considerando lo anteriormente expuesto, las condiciones óptimas de extracción se fijaron en las óptimas descritas para el TPC (75 % de etanol, 20 °C y 11 minutos).

En estas condiciones, se llevó a cabo una extracción donde se obtuvo un extracto con un rendimiento de extracción de $21,20 \% \pm 0,88 \%$, que resultó similar al valor teórico (22,18 %). El rendimiento del extracto óptimo se encuentra en el rango de valores hallados para extractos PLE de pepitas con agua (García-Mariano y col., 2006), mostrando valores superiores a los obtenidos con agua a 50 °C (4,2 %) pero inferiores a los determinados para 150 °C (37,7 %). De este modo, se corrobora que las mezclas de agua y etanol producen un mayor rendimiento de extracción que cada uno de estos disolventes separadamente. Además, el rendimiento del extracto óptimo fue similar al encontrado para una extracción de pepitas mediante MAE (19,1 %) y superior al determinado para extracciones SLE de pepitas (15,3 y 16,2 %) (Baydar y col., 2007; Li y col., 2011).

3.3.2.1. Caracterización química.

- Análisis HPLC-RP.

La caracterización de la composición fenólica de los monómeros presentes en el extracto óptimo de pepitas, junto con algunos dímeros, se muestra en la Tabla 29. Este extracto se caracterizó por una extensa composición en flavanoles, los cuales representan la fracción mayoritaria del perfil fenólico. En este sentido, destaca el contenido en epicatequina, seguido del de la catequina y una cantidad importante dímero B₂.

Con respecto al resto de compuestos fenólicos, se identificaron ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos) y flavonoles (quercetina y sus derivados), todos en cantidades pequeñas, a excepción del ácido gálico que resultó el más abundante entre todos ellos.

Tabla 29. Composición fenólica del extracto óptimo de pepitas (mg de compuesto / g de extracto).

EXTRACTO ÓPTIMO DE PEPITAS			
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	1,033 ± 0,003
		Ácido Protocatéquico	0,007 ± 0,000
		Monogaloil glucósido	0,434 ± 0,006
		Ácido Elágico	0,019 ± 0,001
		Aldehído Protocatéquico	0,020 ± 0,001
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	0,028 ± 0,001
		Ácido p-Cumárico	0,039 ± 0,000
		Ácido 3-Cumárico	0,013 ± 0,001
FLAVONIODES	FLAVANOLES	Catequina	21,865 ± 0,316
		Epicatequina	44,221 ± 0,089
		Galato de catequina	0,024 ± 0,000
		Galato de epicatequina	2,949 ± 0,024
		Dímero B1	2,798 ± 0,063
		Dímero B2	8,761 ± 0,235
		Dímero A2	0,508 ± 0,082
	FLAVONOLES	Quercetina-3-O-glucuronido	0,008 ± 0,001
		Quercetina-3-O-glucósido	0,078 ± 0,001
		Quercetina	Trazas

Coincidiendo con estos resultados, otros estudios indicaron que los flavanoles eran los compuestos principales de extractos de pepitas, tanto de la variedad Merlot (Choy y col., 2013; Prodanov y col., 2013), como de otras variedades de *Vitis vinifera* (Obreque-Slier y col., 2012).

Así, la catequina, epicatequina, galato de epicatequina y los dímeros B₁ y B₂ se han identificado previamente en extractos de pepitas de la variedad Merlot. El contenido de estos compuestos determinado para el extracto óptimo de este trabajo fue notablemente superior al obtenido en un extracto SLE de pepitas de Merlot (Lorrain y col., 2011), mientras que se encontró en el intervalo de valores determinados por Chira y col., (2009) para dos añadas de esta variedad. Del mismo modo, mientras que el primer estudio muestra cantidades de epicatequina notablemente superiores respecto a las de catequina, coincidiendo así con nuestro extracto, en el segundo estudio el contenido de ambos fue semejante, encontrándose además otras procianidinas diméricas no analizadas en este extracto como la B₃ y B₄.

Junto con los flavanoles, en las pepitas de esta variedad pueden encontrarse cantidades importantes de ácido gálico y cantidades notablemente inferiores de otros compuestos como el ácido protocatéquico (Montealegre y col., 2006).

Además, otros autores también han encontrado pequeñas cantidades, en extractos procedentes de otras variedades de pepitas, otros compuestos como los ácidos caftárico y p-cumárico, junto con la quercetina-3-O-glucósido (Anastasadi y col., 2009), derivados glucosilados del ácido gálico, el aldehído protocatéquico, la quercetina-3-O-glucurónido (Di Lecce y col., 2014), el ácido elágico (Prodanov y col., 2013) o el galato de catequina (Bucić-Kojić y col., 2009).

- Análisis de proantocianidinas.

El contenido total en proantocianidinas presentes en el extracto óptimo de pepitas, así como su composición de unidades monoméricas se determinó siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente en el apartado del raspón. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30. Caracterización fenólica de la fracción de proantocianidinas poliméricas del extracto óptimo de pepitas.

<i>Composición Fenólica (%)</i>						
<i>Unidades Terminales</i>			<i>Unidades de Extensión</i>			
Catequina	Epicatequina	Galato de Epicatequina	Catequina	Epicatequina	Galato de Epicatequina	Epigallocatequina
1,99	1,23	2,13	8,00	61,99	24,65	0,00

La composición fenólica de las proantocianidinas en unidades monoméricas se caracterizó principalmente por unidades de extensión de epicatequina y de galato de epicatequina. Por el contrario, las unidades terminales resultaron ser principalmente de galato de epicatequina, y en menor medida, de catequina. Por el contrario, no se observó la presencia de epigallocatequina en las unidades de extensión, tal y como se ha descrito previamente que sucede para este tipo de muestras (Souquet y col., 2000; Sun y Spranger, 2005). De este modo, casi el 30 % de las unidades monoméricas se presentaron en forma galoilada ($26,78 \% \pm 0,06 \%$).

Así, la elevada proporción de unidades de extensión frente a las unidades terminales indicó un grado de polimerización medio (mDP) equivalente a $18,67 \pm 0,11$. Para dicha fracción, la masa molecular media se determinó en $5422,23 \pm 32,79$.

El contenido total de la fracción polimérica resultó ser de $340,33 \pm 6,36$ mg de catequina/g de extracto, resultando similares a los resultados obtenidos mediante cromatografía en fase normal aplicada al extracto óptimo de pepitas ($361,58 \pm 5,65$ mg de catequina/ g de extracto). Estos datos confirman lo expuestos previamente, donde las proantocianidinas poliméricas son los compuestos mayoritarios del extracto.

Respecto a la composición en proantocianidinas (oligoméricas y poliméricas) de los extractos de pepitas, se puede observar que existe una gran disparidad de datos en la bibliografía. De este modo, para este tipo de muestras, tanto de uva Merlot como de otras, se ha estipulado que el mDP puede variar entre valores de 2 a 20 unidades (Kalili y col., 2013; Ćurko y col., 2014), donde frecuentemente se encuentra un valor de 10 unidades (Monagas y col., 2006), aunque Sun y col., (1998) indicaron que en la fracción de las proantocianidinas poliméricas pueden encontrarse compuestos con un mDP de hasta 31 unidades. Hay que tener en cuenta, que este valor puede sufrir importantes variaciones en función de la variedad, del área geográfica de cultivo, la añada, de la

maduración del fruto, así como de las condiciones de extracción de las procianidinas. (Eriz y col., 2011; Brodiga y col., 2011).

El contenido en proantocianidinas galoiladas para el extracto óptimo de pepitas resultó próximo al 30 % de las unidades totales. Estos datos coinciden con los determinados en la bibliografía para esta variedad, donde los resultados oscilan entre el 22,4 % y el 32,45, próximos al 30 % con mayor frecuencia (Souquet y col., 2000; Lorrain y col., 2011; Obreque-Slier y col., 2012).

Con respecto a la composición en unidades monoméricas de la fracción de proantocianidinas, los resultados obtenidos para el extracto óptimo fueron próximos a los determinados por Souquet y col., (2000) para esta misma variedad, quienes indican una composición principalmente de unidades de epicatequina (54,36 %), seguida de galato de epicatequina (32,45) y donde la catequina está en una proporción notablemente inferior (13,19 %), mientras que la epigallocatequina no fue encontrada.

3.3.2.2. Caracterización funcional.

- Actividad antioxidante.

Los valores de actividad antioxidante del extracto óptimo de pepitas, así como de TPC se muestran en la Tabla 31. Para ambos ensayos, los resultados obtenidos resultaron similares a los valores teóricos.

Tabla 31. Valores de actividad antioxidante y TPC del extracto óptimo de pepitas.

<i>Extracto Óptimo de Pepitas</i>		
	<i>Valores Experimentales</i>	<i>Valores Teóricos</i>
ABTS (mmol Trolox/g Extracto)	9,31 ± 0,33	9,11
TPC (mg GAE/g Extracto)	350,80 ± 3,97	354,02

El contenido fenólico del extracto óptimo (74,37 mg ± 0,84 mg de GAE/g de pepita seca) se encontró en el intervalo de valores determinados para las pepitas (Lachman y col., 2013; Porto y col., 2013; de Sá y col., 2013). Sin embargo, el TPC de dicho extracto resultó notablemente superior al determinado para extractos SLE obtenidos a

partir de pepitas de la variedad Merlot, cuyos valores oscilan entre 38,45 mg de GAE a 45,3 mg de GAE/g de pepita (Yilmaz y Toledo, 2006; Lorrain y col., 2011; Obrequeslier y col., 2012). De este modo, los datos mostrados sugieren que las extracciones a partir de pepitas mediante PLE resultan más eficientes (García-Mariano y col., 2006), donde además, las mezclas de solvente permiten extracciones de compuestos fenólicos mayores como ya se ha comentado con anterioridad para el capítulo del raspón. Además, resulta interesante indicar que el extracto óptimo mostró un TPC similar al determinado para un extracto SLE de pepita purificado mediante resinas de amberlita (373 mg de GAE/g de extracto) (Lorenzano y col., 2013).

Sin embargo, diversos extractos SLE a partir de otras variedades de pepitas mostraron valores de TPC superiores a los determinados en este estudio (Makris y col., 2007b; Bucić-Kojić y col., 2009; Rockenbach y col., 2011). En este sentido, hay que considerar, como se comentó con anterioridad, que tanto la variedad, como el área de cultivo, la añada o el método de extracción y solventes empleados pueden provocar diferencias en el contenido de compuestos fenólicos de los extractos.

Con respecto a la actividad antioxidante, cabe destacar que el extracto óptimo mostró un valor TEAC ligeramente superior al de un extracto comercial de pepitas, con un elevado contenido en compuestos fenólicos (7 mmol de trolox/g de extracto) (Furiga y col., 2009), mientras que por el contrario, resultó ligeramente inferior al encontrado para un extracto de pepitas purificado mediante resinas (11,31 mmol de trolox/g de extracto) (Lorenzo y col., 2013).

Igualmente, con el objetivo de establecer una mayor comparación con otros estudios, se llevó a cabo la determinación de la actividad antioxidante del extracto óptimo mediante el método de ORAC. Dicho extracto mostró un valor de $3135 \mu\text{mol} \pm 0,403 \mu\text{mol}$ de trolox/g de extracto ($664 \mu\text{mol/g}$ de pepita seca). Estos datos resultaron superiores a los encontrados por Yilmaz y Toledo (2006) para un extracto SLE de pepitas de Merlot (344 mmol de trolox/g de extracto), lo cual concuerda con el TPC de ambos extractos. Por el contrario, su actividad resultó inferior a la de un extracto comercial purificado de pepitas (16 mmol de trolox/g de extracto).

- Actividad antiinflamatoria.

La medida *in vitro* de la actividad antiinflamatoria del extracto óptimo de pepitas se realizó mediante la utilización de macrófagos humanos de la línea THP-1, tal y como se describió previamente en el apartado correspondiente al raspón, utilizándose también dos modelos de inflamación, uno en el que se incorpora LPS al medio de cultivo de los macrófagos y otro modelo mediado por un proceso de oxidación mediante la adicción de LDLox al medio de cultivo.

Para este estudio se emplearon concentraciones del extracto de 5, 10 y 20 µg/mL, siendo 20 µg/mL la máxima concentración no citotóxica (datos no mostrados). Para la indometacina se empleó una concentración no citotóxica de 5 µg/mL.

La estimulación de los macrófagos durante 24 horas con 75 µg/mL de LDLox dio lugar a un incremento en la secreción de TNF-α de aproximadamente un 60 % comparado con la situación basal, representada por el control negativo (Figura 47).

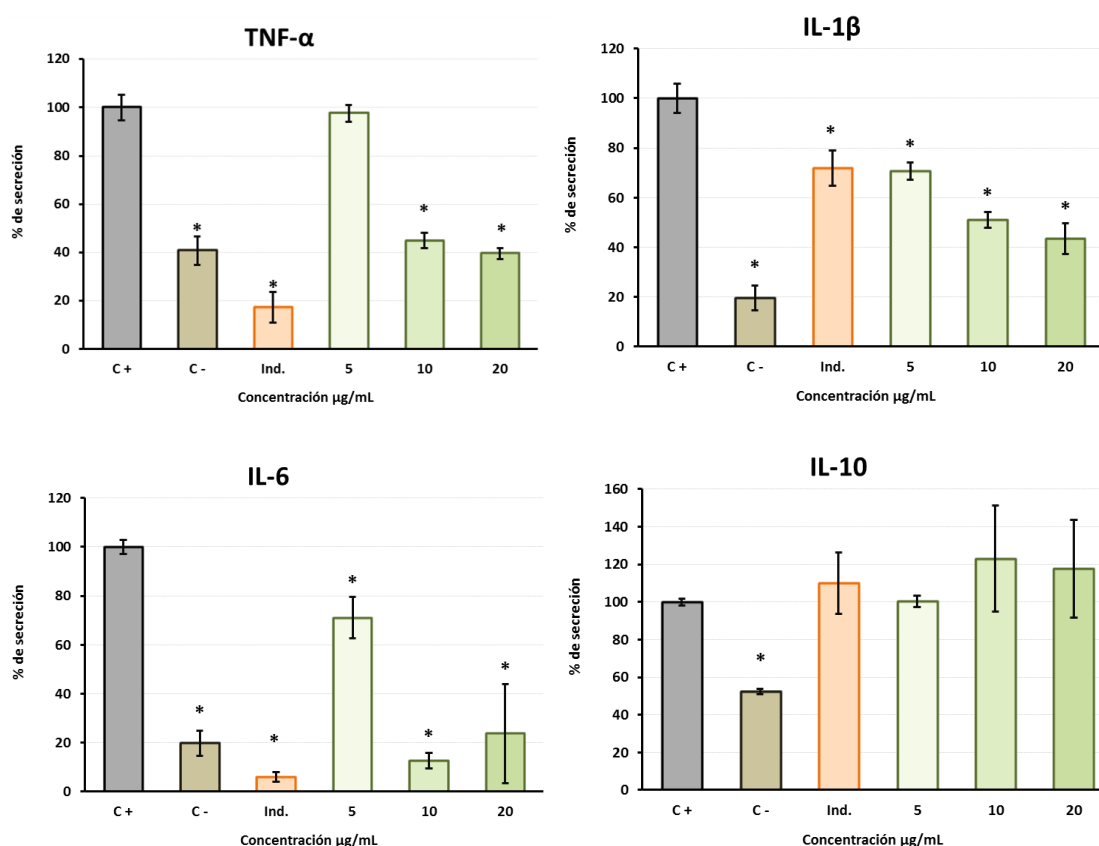


Figura 47. Secreción de interleuquinas en macrófagos activados con LDLox en presencia del extracto óptimo de pepita e indometacina (Ind.). *diferencias significativas respecto al control + ($p \leq 0,05$).

La adición del extracto óptimo de pepitas a los macrófagos estimulados produjo una importante disminución en la liberación de TNF- α al medio de cultivo cuando las concentraciones utilizadas fueron 10 $\mu\text{g/mL}$ y 20 $\mu\text{g/mL}$, llegando incluso a los niveles basales.

La adición de LDLox al medio provocó un incremento en la secreción de la citoquina IL-1 β del 80 % con respecto al nivel basal. Para esta citoquina, el extracto óptimo de pepitas mostró tener un efecto importante para todas las concentraciones estudiadas. Así, a 5 $\mu\text{g/mL}$ la reducción de la IL-1 β fue similar al observado para la indometacina (20 %), mientras que con 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ se redujo la secreción de esta citoquina en un 50 %.

Al igual que para las citoquinas anteriores, la exposición de los macrófagos a las LDLox se tradujo en un incremento en la liberación de la citoquina IL-6. Para esta citoquina, la acción del extracto a 10 $\mu\text{g/mL}$ y 20 $\mu\text{g/mL}$ redujo su secreción hasta niveles basales. Sin embargo, a 5 $\mu\text{g/mL}$ tan solo disminuyó su liberación en aproximadamente un 20 %.

Con respecto a la citoquina antiinflamatoria IL-10, la adición del extracto no produjo variación en su secreción.

Con todo ello, podemos indicar que la incorporación de pequeñas cantidades de extracto óptimo de pepitas, 10 $\mu\text{g/mL}$, dio lugar a una reducción en la secreción de todas las citoquinas proinflamatorias estudiadas, lo que demuestra la importante capacidad antiinflamatoria de este extracto en modelos de inflamación mediados por un proceso de oxidación.

La estimulación de los macrófagos con LPS (0,05 $\mu\text{g/mL}$) provocó un incremento en la secreción de todas las citoquinas proinflamatorias estudiadas, con respecto a la situación basal (control negativo). Sin embargo, y contrariamente a lo observado para la estimulación con LDLox, la incorporación de extracto al medio del cultivo no modificó la secreción de estas citoquinas (Figura 48). Para la citoquina antiinflamatoria IL-10, la estimulación de los macrófagos con LPS en presencia del extracto no dio lugar a un incremento en la secreción de esta citoquina.

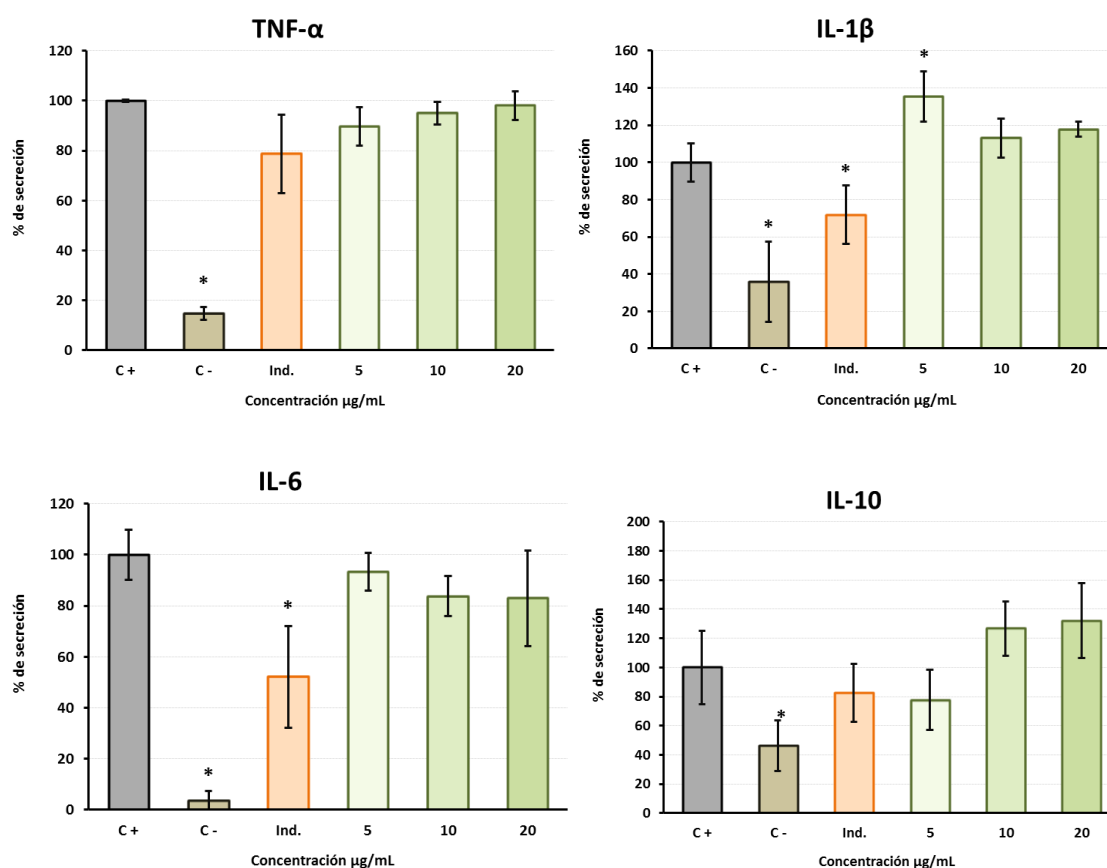


Figura 48. Secreción de interleuquinas en macrófagos activados con LPS en presencia del extracto óptimo de pepita e indometacina (Ind.). *diferencias significativas respecto al control + ($p \leq 0,05$).

Como conclusión se puede decir que, para los dos modelos de inflamación estudiados, tan sólo se observó un claro efecto antiinflamatorio por parte del extracto óptimo de pepitas en el modelo mediado por oxidación.

Al establecer una comparación de la actividad antiinflamatoria del extracto óptimo de pepitas con respecto al óptimo de raspón puede observarse el mismo patrón para ambos extractos. En este sentido, los dos presentaron una importante actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación mediado por LDLox mientras que no mostraron una actividad significativa en el modelo mediado por LPS. Así, para la inflamación iniciada por LDLox, ambos extractos muestran una actividad antiinflamatoria similar frente a las interleuquinas TNF- α y IL-1 β mientras que para la IL-6 el efecto del extracto de raspón resultó ligeramente superior. Asimismo, ninguno de los extractos mostraron efectos en la secreción de la interleuquina IL-10.

3.3.2.3. Biodisponibilidad.

3.3.2.3.1. Digestión in vitro.

- Composición fenólica.

La composición fenólica del extracto según el grado de polimerización en cada una de las etapas que componen la digestión se muestra en la Tabla 32.

Tabla 32. Perfil fenólico del extracto óptimo de pepitas según su grado de polimerización durante el proceso digestivo (g de catequina por L de extracto).

	<i>Inicial</i>	<i>Bucal</i>	<i>Estomacal</i>	<i>Intestinal</i>
Monómeros y oligómeros	2,68 ± 0,01 ^a	2,65 ± 0,05 ^a	1,98 ± 0,16 ^b	1,57 ± 0,10 ^c
Polímeros solubles en metanol	12,65 ± 0,24 ^a	11,34 ± 0,49 ^a	2,15 ± 1,12 ^b	2,55 ± 0,54 ^b
Polímeros solubles en agua	0,15 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,00 ^a	0,00	0,00
Polímeros totales	12,80 ± 0,21 ^a	11,46 ± 0,49 ^a	2,15 ± 1,12 ^b	2,55 ± 0,54 ^b

^{a,b,c,d} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Así, durante la etapa bucal se producen solamente pequeños cambios en la composición fenólica del extracto, con ligeras pérdidas de polímeros. Sin embargo, tras la digestión estomacal se observa un descenso importante para todos los tipos de compuestos, principalmente de polímeros solubles en metanol, mientras que tras la digestión intestinal tan solo se observó un ligero descenso en el grupo de los monómeros y oligómeros. De este modo, la digestión provocó una disminución acusada de los compuestos fenólicos totales presentes en el extracto, especialmente de los compuestos poliméricos.

Como ya se comentó anteriormente en el capítulo del raspón, esta pérdida de compuestos fenólicos poliméricos durante el proceso digestivo se ha relacionado con la degradación ácida de las proantocianidinas, así como con una posible precipitación por interacción de estas con las enzimas digestivas.

En cuanto a la composición del extracto en monómeros y oligómeros fenólicos a lo largo del proceso de la digestión, en la Tabla 33 se muestran los resultados obtenidos en cada una de las etapas que componen dicho proceso. De modo general y coincidiendo con los datos anteriormente mencionados, durante la etapa bucal se observaron pequeñas variaciones en la composición del extracto, mientras que los cambios más

significativos se sucedieron principalmente durante la etapa estomacal y también la etapa intestinal.

Tabla 33. Composición fenólica del extracto óptimo de pepitas durante el proceso digestivo (mg de compuesto / L de extracto).

			EXTRACTO ÓPTIMO DE PEPITAS			
			Inicial	Bucal	Estomacal	Intestinal
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	40,65 ± 0,12 ^a	38,02 ± 0,23 ^b	38,35 ± 0,34 ^b	36,41 ± 0,26 ^c
		Ácido Protocatéquico	0,23 ± 0,01 ^b	0,22 ± 0,01 ^b	0,24 ± 0,02 ^b	0,30 ± 0,01 ^a
		Monogaloil glucósido	15,73 ± 0,17 ^a	15,97 ± 0,20 ^a	11,69 ± 0,08 ^b	11,47 ± 0,95 ^b
		Ácido Elágico	0,48 ± 0,05 ^a	0,44 ± 0,01 ^{a,b}	0,39 ± 0,02 ^{b,c}	0,35 ± 0,01 ^c
		Áldehido Protocatéquico	0,65 ± 0,02 ^a	0,57 ± 0,07 ^a	Nd	Nd
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	0,86 ± 0,01 ^a	0,76 ± 0,02 ^b	0,70 ± 0,01 ^c	0,64 ± 0,02 ^d
		Ácido p-Cumárico	1,20 ± 0,01 ^a	1,07 ± 0,03 ^b	0,93 ± 0,03 ^d	1,00 ± 0,02 ^c
		Ácido 3-Cumárico	0,75 ± 0,01 ^a	0,76 ± 0,04 ^a	0,43 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,01 ^c
FLAVONOIDES	FLAVANOLÉS	Catequina	972,15 ± 22,64 ^a	949,28 ± 1,48 ^a	640,48 ± 14,88 ^b	540,84 ± 6,79 ^c
		Epicatequina	1326,50 ± 2,66 ^a	1253,57 ± 22,1 ^b	664,30 ± 1,33 ^c	503,47 ± 3,19 ^d
		Galato de catequina	1,03 ± 0,11 ^a	1,07 ± 0,05 ^a	0,25 ± 0,03 ^c	0,39 ± 0,02 ^b
		Galato de epicatequina	117,80 ± 0,56 ^a	102,80 ± 0,94 ^b	45,30 ± 0,09 ^c	47,64 ± 0,07 ^d
		Dímero B1	232,83 ± 0,51 ^b	238,56 ± 3,95 ^a	231,90 ± 0,63 ^b	86,21 ± 2,32 ^c
		Dímero B2	355,68 ± 0,45 ^a	334,46 ± 6,16 ^b	205,45 ± 0,24 ^c	194,10 ± 2,46 ^d
		Dímero A2	13,19 ± 0,55 ^a	14,18 ± 0,63 ^a	7,18 ± 0,17 ^b	2,26 ± 0,85 ^c
	FLAVONOLÉS	Quercetina-3-O-glucuronido	0,40 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,01 ^b	0,07 ± 0,02 ^c	0,29 ± 0,03 ^b
		Quercetina-3-O-glucósido	3,03 ± 0,00 ^a	2,83 ± 0,04 ^a	1,89 ± 0,18 ^b	2,00 ± 0,02 ^b
		Quercetina	Trazas	Trazas	Nd	Nd

^{a,b,c,d} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Así, el efecto de la digestión sobre la composición fenólica del extracto de pepitas mostró un perfil similar al observado previamente para el extracto óptimo de raspón, caracterizado por pérdidas intensas de flavanoles, mientras que los ácidos fenólicos y los flavonoles resultaron más resistentes. En este sentido, Laurent y col., (2007) observaron que durante la digestión de un extracto de pepitas se producían pérdidas importantes de catequina, epicatequina y de los dímeros B₁ y B₃, como consecuencia principalmente de la interacción de estos compuestos con las enzimas digestivas.

- Actividad antioxidante.

Con la intención de conocer el efecto de la digestión sobre la actividad antioxidante del extracto óptimo de pepitas, se analizó dicha actividad para cada una de las etapas de la digestión (Figura 49). Así, en la etapa bucal no se produjeron cambios significativos de dicha actividad mientras que, durante la etapa estomacal se observó un notable descenso de la actividad antioxidante, manteniéndose estable durante la etapa intestinal. Con todo ello, tras el proceso digestivo se produjo un descenso de la actividad del extracto equivalente al 29 % del valor inicial. En este sentido, Henning y col., (2014) observaron una pérdida de actividad antioxidante en un extracto de pepitas tras el proceso digestivo (10 %), aunque dicha pérdida resultó inferior a la determinada para el extracto de este estudio.

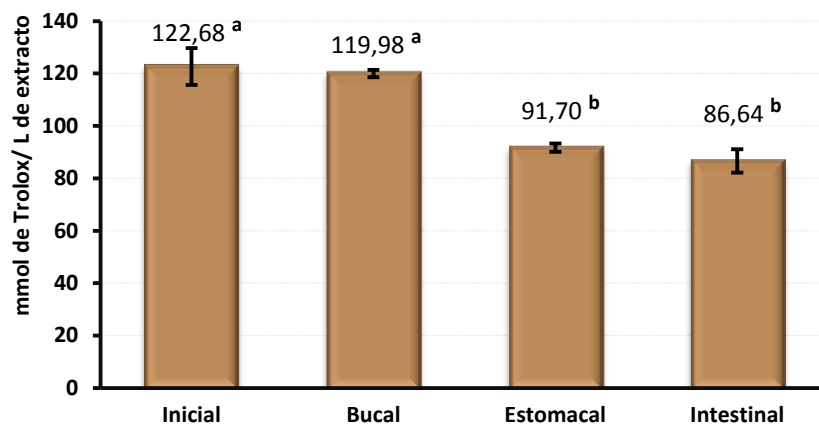


Figura 49. Valor TEAC del extracto óptimo de pepitas durante el proceso digestivo.

^{a,b}, Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Además de la actividad antioxidante, también se evaluó el efecto de la digestión sobre el contenido total de compuestos fenólicos, el cual se determinó antes y después del proceso digestivo. En este sentido, el extracto de pepitas experimentó tras dicho proceso una reducción en su TPC similar a la encontrada en la actividad antioxidante (33% del valor inicial) (Figura 50).

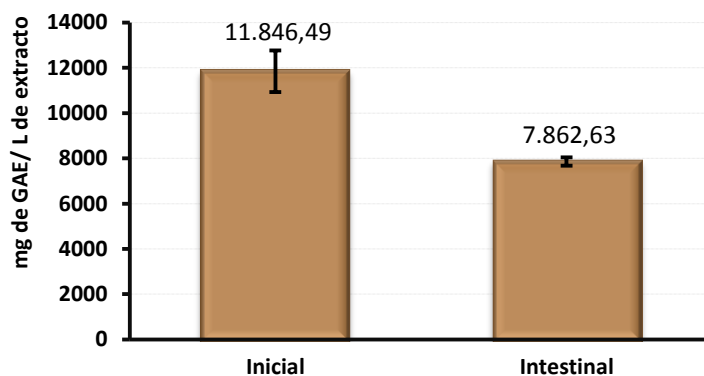


Figura 50. TPC al inicio y final del proceso digestivo.

Para determinar que fracción fenólica del extracto es la responsable de la actividad antioxidante durante la digestión, se estableció la correlación existente entre cada una de las fracciones según su grado de polimerización a lo largo de la digestión y la actividad antioxidante de cada una de las etapas (Tabla 33).

Tabla 33. Análisis de correlación simple para la actividad antioxidante durante la digestión y los diferentes grupos de compuestos fenólicos según su grado de polimerización en el extracto óptimo de pepitas.

	<i>DPPH - Oligómeros</i>	<i>DPPH – Polímeros (Metanol)</i>	<i>DPPH – Polímeros (Agua)</i>	<i>DPPH – Polímeros Totales</i>
R	0,8858**	0,9673***	0,9666**	0,9669***

Diferentes * muestran diferentes niveles de significación. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

Los resultados indican que todas las fracciones muestran una correlación importante con la actividad antioxidante, siendo mayor para los compuestos poliméricos que para los monómeros-oligómeros. Así, la pérdida de actividad antioxidante del extracto estaría ligada a la pérdida de polímeros fenólicos, además de otros posibles cambios que pueden experimentar los monómeros y oligómeros durante dicho proceso.

3.3.2.3.2. Absorción intestinal.

- Composición fenólica.

En la Tabla 35 se muestran los resultados obtenidos del estudio de la composición fenólica en la fracción biodisponible tras la absorción intestinal del digerido del extracto óptimo de pepitas.

Tabla 35. Absorción intestinal de los compuestos fenólicos presentes en la fase intestinal (mg de compuesto / L de extracto).

		EXTRACTO ÓPTIMO DE PEPITAS		
		Digerido	Apical	Basolateral
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	36,41 ± 0,26	25,35 ± 0,11
		Ácido Protocatéquico	0,30 ± 0,01	0,53 ± 0,01
		Monogaloil glucósido	11,47 ± 0,95	9,37 ± 0,64
		Ácido Vainíllico	Nd	Nd
		Ácido Elágico	0,35 ± 0,01	0,21 ± 0,01
		Áldehido Protocatéquico	0,00	Nd
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	0,64 ± 0,02	0,62 ± 0,00
		Ácido p-Cumárico	1,00 ± 0,02	0,63 ± 0,00
		Ácido 3-Cumárico	0,14 ± 0,01	0,55 ± 0,03
FLAVONOIDES	FLAVANOL	Catequina	540,84 ± 6,79	394,81 ± 11,53
		Epicatequina	503,47 ± 3,19	410,20 ± 31,10
		Galato de catequina	0,39 ± 0,	0,12 ± 0,02
		Galato de epicatequina	47,64 ± 0,07	21,12 ± 2,44
		Dímero B1	86,21 ± 2,32	90,39 ± 0,87
		Dímero B2	194,10 ± 2,46	175,47 ± 2,16
		Dímero A2	2,26 ± 0,85	2,44 ± 0,20
	FLAVONOL	Quercetina-3-O-glucuronido	0,29 ± 0,03	0,37 ± 0,03
		Quercetina-3-O-glucósido	2,00 ± 0,02	1,18 ± 0,06
		Quercetina	Nd	Nd

Los datos obtenidos indican que la fracción fenólica mayoritaria en el compartimento basolateral correspondió a los flavanoles, donde se detectaron todos los compuestos a excepción del dímero A₂. En este sentido, los flavanoles principales fueron la catequina y epicatequina, encontrándose además cantidades importantes del dímero B₂, el galato de epicatequina y el dímero B₁.

Sin embargo, la biodisponibilidad de los ácidos fenólicos resultó baja. Con respecto al ácido vainíllico, no presente previamente en el extracto, hay que indicar que este compuesto puede aparecer como un producto de metabolización de otros ácidos fenólicos, tal y como hemos podido observar en ensayos de absorción del ácido protocatéquico (datos no mostrados).

Con respecto a los flavonoles, tan sólo se produjo una pequeña absorción de la quercetina-3-O-glucósido, mientras que la quercetina-3-O-glucurónido no se detectó en la fracción biodisponible.

Como ya se indicó en el capítulo relativo al raspón, la absorción intestinal de todos estos compuestos ha sido demostrada previamente. En este sentido, Serra y col. (2010) observaron en un modelo intestinal simulado que a partir del digerido de un extracto de pepitas se producía una amplia absorción tanto de catequina y epicatequina (próximos al 20 % en ambos) como de otros compuestos como galato de epicatequina, dímeros y trímeros. Además, en ese mismo estudio, la absorción intestinal de estos compuestos evaluada en ratas mostró ratios de absorción notablemente superiores que en el modelo simulado. Del mismo modo, Prasain y col., (2009) detectaron en sangre de ratas catequina, metabolitos metilados de este compuestos y diversos oligómeros hasta trímeros, coincidiendo estos datos con lo indicado para la absorción de flavanoles por células Caco-2 (Deprez y col., 2001). Así, estos datos coinciden con el perfil de absorción encontrado para el digerido del extracto óptimo de pepitas.

- *Actividad antioxidante.*

La actividad antioxidante del digerido del extracto óptimo de pepitas, así como de la fracción apical y la basolateral se muestra en la Figura 51. Asimismo, se determinó el TPC en cada una de las fracciones, reflejándose los resultados en la Figura 52.

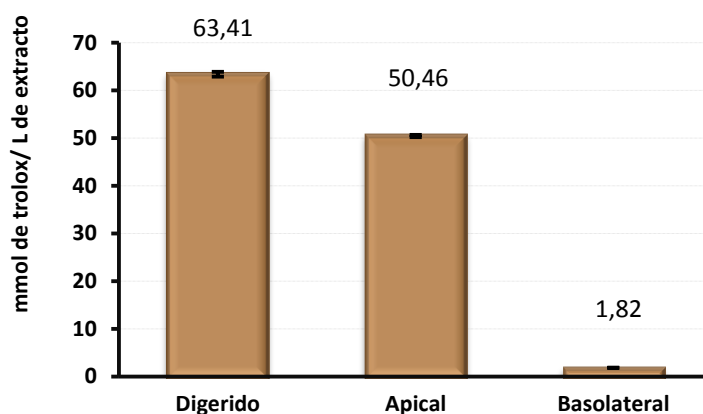


Figura 51. Valor TEAC en la fracción biodisponible tras seis horas de absorción intestinal.

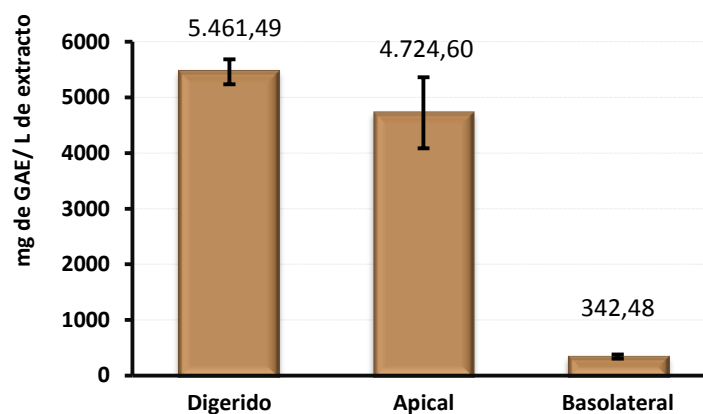


Figura 52. TPC en la fracción biodisponible tras seis horas de absorción intestinal.

Tras el proceso de absorción intestinal, en la fracción biodisponible (basolateral) se observó un valor TEAC equivalente a 1,82 mmol de trolox/L de extracto. Asimismo, en dicha fracción se encontró aproximadamente un 6 % del TPC presente en el digerido de pepitas, aportando no obstante una cantidad de compuestos fenólicos notable a esta fracción (342,48 mg GAE/L de extracto).

En este sentido, se puede indicar que la actividad antioxidante determinada en la fracción biodisponible estaría aportada fundamentalmente por los flavanoles, principalmente en forma de catequina y epicatequina, junto con cantidades menores de los ácidos vainílico y gálico.

A partir de los datos obtenidos, podemos concluir que el extracto óptimo de pepitas presenta una elevada actividad antioxidante como consecuencia de su contenido alto en compuestos fenólicos. Dicho extracto está compuesto principalmente por compuestos fenólicos de origen polimérico, y en menor medida por fenoles monoméricos, donde destacan los flavanoles. Sin embargo, durante el proceso digestivo se produce una fuerte reducción en su contenido fenólico, fundamentalmente de polímeros, lo que se traduce en una disminución de su actividad antioxidante. Tras los estudios de absorción la actividad antioxidante del extracto se reduce de una manera importante, aunque la fracción biodisponible de dicho extracto todavía presenta una destacada actividad antioxidante, debida en su mayor parte a los flavanoles, donde destacan la catequina y epicatequina.

Al comparar la biodisponibilidad del extracto óptimo de pepitas con respecto al del raspón puede concluirse que ambos mostraron un comportamiento similar. En este sentido, al igual que sucedía en la digestión del extracto óptimo de raspón, la elevada

composición de polímeros del extracto es la responsable del descenso de la actividad antioxidante por pérdida de los mismos. No obstante, el contenido de monómeros y dímeros presentes en el extracto de pepitas tanto al inicio como al final de la digestión resultó superior respecto al de raspón. Como consecuencia, la actividad antioxidante de la fracción basolateral resultó superior para el extracto óptimo de pepitas, la cual se caracterizó también por la presencia de flavanoles principalmente, junto con cantidades inferiores de ácidos fenólicos.

3.3.3. Obtención y caracterización de un extracto enriquecido en monómeros.

Siguiendo el mismo esquema que para el raspón se decidió llevar a cabo un proceso de enriquecimiento, del extracto óptimo de pepitas, en los monómeros y oligómeros. Para ello, se aplicó el mismo método de ultrafiltración descrito previamente para el extracto óptimo de raspón. En este caso, es la única estrategia de enriquecimiento empleada, ya que durante la realización del diseño no se encontró ningún extracto con un elevado contenido en monómeros y oligómeros, y con una baja cantidad de polímeros.

De este modo, se separó el extracto original en dos fracciones: una en la que se concentraron principalmente los polímeros fenólicos que no atravesaron la membrana (retenido) y otra donde se recogió la fracción capaz de atravesar la membrana (permeado), cuyo rendimiento fue de un 62 %. Esta última fracción se encontraba caracterizada por un enriquecimiento en compuestos mono- y oligoméricos, con una ausencia prácticamente total en compuestos poliméricos (Figura 53).

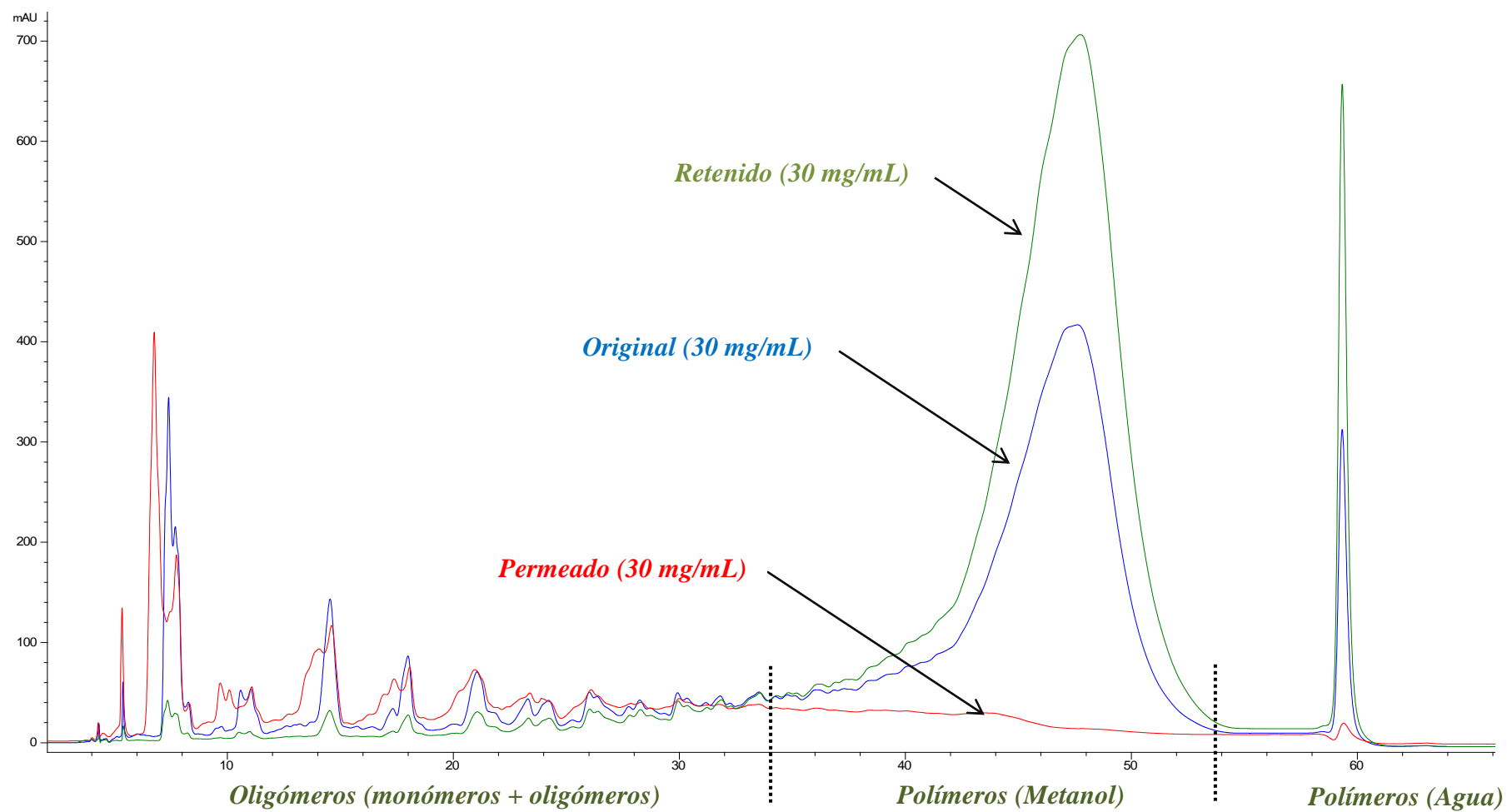


Figura 54. Perfil fenólico del extracto óptimo de pepitas y del permeado y retenido según su grado de polimerización (30mg/mL).

3.3.3.1. Caracterización química y funcional.

La caracterización del perfil fenólico en monómeros y dímeros del permeado de pepitas mostró, como era de esperar, un perfil similar al del extracto original (óptimo), a excepción del ácido elágico, que no se encontró en el permeado (Tabla 36). Aunque, como también era previsible, su contenido en compuestos fenólicos monoméricos fue muy superior al del extracto original, destacando un incremento notable de la catequina y el dímero B₁. Así, tal y como se indicó previamente en el capítulo del raspón, en general, el proceso de ultrafiltración duplicó el contenido en compuestos fenólicos.

Tabla 36. Composición fenólica del extracto óptimo de pepitas y su permeado (mg de compuesto / g de extracto).

			PERMEADO	ÓPTIMO
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	2,101 ± 0,052 ^a	1,033 ± 0,003 ^b
		Ácido Protocatéquico	0,011 ± 0,000 ^a	0,007 ± 0,000 ^b
		Monogaloil glucósido	0,845 ± 0,042 ^a	0,434 ± 0,006 ^b
		Ácido Elágico	Nd	0,019 ± 0,001
		Áldehido Protocatéquico	0,010 ± 0,003 ^b	0,020 ± 0,001 ^a
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	0,045 ± 0,004 ^a	0,028 ± 0,001 ^b
		Ácido p-Cumárico	Coeluye	0,039 ± 0,000
		Ácido 3-Cumárico	0,028 ± 0,007 ^a	0,013 ± 0,001 ^b
FLAVANOIDES	FLAVANOLES	Catequina	59,397 ± 2,488 ^a	21,865 ± 0,316 ^b
		Epicatequina	68,416 ± 2,558 ^a	44,221 ± 0,081 ^b
		Galato de catequina	0,046 ± 0,007 ^a	0,024 ± 0,000 ^b
		Galato de epicatequina	5,388 ± 0,457 ^a	2,949 ± 0,024 ^b
		Dímero B1	12,853 ± 1,158 ^a	2,798 ± 0,063 ^b
		Dímero B2	17,356 ± 1,657 ^a	8,761 ± 0,235 ^b
		Dímero A2	0,613 ± 0,012 ^a	0,508 ± 0,082 ^b
	FLAVONOLES	Quercetina-3-O-glucuronido	Trazas	0,008 ± 0,001
		Quercetina-3-O-glucósido	0,118 ± 0,005 ^a	0,078 ± 0,001 ^b
		Quercetina	0,026 ± 0,011	Trazas

^{a,b} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

El contenido de compuestos fenólicos totales del permeado fue de $210,04 \pm 13,03$ mg de GAE/g de extracto, mostrando un valor TEAC de $4,33 \pm 0,02$ mmol de trolox/g de extracto según el método del radical ABTS^{•+}. De este modo, la reducción en el TPC con

respecto al del extracto original (354,80 mg GAE/g de extracto) provocada por la eliminación de la fracción polimérica explicaría la reducción observada en la actividad antioxidante. Estos resultados están en concordancia con los datos aportados en el apartado anterior, donde se indicaba que la actividad antioxidante del extracto óptimo se atribuye, en buena medida, a la fracción de polímeros fenólicos, la cual constituía la fracción fenólica mayoritaria en el extracto.

3.3.3.2. Biodisponibilidad.

3.3.3.2.1. Digestión in vitro.

- Composición fenólica.

La composición fenólica del permeado durante el proceso de la digestión se muestra en la Tabla 37.

Tabla 37. Composición fenólica del permeado de pepitas durante el proceso digestivo (mg de compuesto/L de extracto).

			PERMEADO DE PEPITAS			
			Inicial	Bucal	Estomacal	Intestinal
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	63,49 ± 1,58 ^a	60,64 ± 0,01 ^a	64,31 ± 0,36 ^a	54,79 ± 5,14 ^b
		Ácido Protocatéquico	0,33 ± 0,01 ^b	0,26 ± 0,01 ^c	0,40 ± 0,01 ^a	0,41 ± 0,04 ^a
		Monogaloil glucósido	25,36 ± 1,26 ^a	24,03 ± 0,13 ^{a,b}	22,86 ± 1,26 ^b	23,30 ± 1,62 ^{a,b}
		Ácido Elágico	Nd	Nd	Nd	Nd
		Áldehido Protocatéquico	0,29 ± 0,01 ^a	0,28 ± 0,03 ^a	Nd	Nd
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	1,36 ± 0,13 ^a	1,13 ± 0,01 ^b	1,18 ± 0,03 ^b	0,83 ± 0,02 ^c
		Ácido p-Cumárico	Coeluye	Coeluye	Coeluye	1,78 ± 0,04
		Ácido 3-Cumárico	0,84 ± 0,22 ^a	0,97 ± 0,02 ^a	0,76 ± 0,06 ^{a,b}	0,55 ± 0,08 ^b
FLAVONOIDES	FLAVANOLAS	Catequina	1781,92 ± 74,6 ^a	1644,55 ± 17,2 ^b	1220,94 ± 12,8 ^c	1212,64 ± 45,0 ^c
		Epicatequina	2052,48 ± 76,7 ^a	1781,57 ± 5,6 ^b	1437,11 ± 17,6 ^c	1251,36 ± 41,9 ^d
		Galato de catequina	1,37 ± 0,21 ^a	1,46 ± 0,02 ^a	0,43 ± 0,06 ^b	0,17 ± 0,01 ^c
		Galato de epicatequina	161,63 ± 13,72 ^a	136,19 ± 0,08 ^b	78,60 ± 5,56 ^c	54,92 ± 4,11 ^d
		Dímero B1	385,58 ± 34,73 ^a	409,53 ± 4,79 ^a	269,04 ± 0,57 ^b	169,10 ± 6,04 ^c
		Dímero B2	520,69 ± 49,71 ^a	467,35 ± 0,20 ^b	340,59 ± 0,77 ^c	225,02 ± 7,91 ^d
		Dímero A2	18,39 ± 0,36 ^a	19,55 ± 0,34 ^b	9,33 ± 0,05 ^c	10,06 ± 1,02 ^d
	FLAVONOLAS	Quercetina-3-O-glucuronido	0,77 ± 0,33 ^a	0,60 ± 0,02 ^a	0,49 ± 0,06 ^a	0,69 ± 0,08 ^a
		Quercetina-3-O-glucósido	3,53 ± 0,14 ^a	3,63 ± 0,36 ^a	3,24 ± 0,13 ^a	2,70 ± 0,08 ^b
		Quercetina	Trazas	Trazas	Nd	Nd

^{a,b,c,d} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Al igual que sucedía con el extracto óptimo, durante la etapa bucal se observaron tan solo cambios ligeros en la composición del permeado, mientras que durante la etapa gástrica e intestinal se sucedieron los cambios más significativos, aunque la pérdida de monómeros y dímeros durante la digestión del permeado resultó menor a la registrada en el extracto óptimo.

En este sentido, el proceso de digestión mostró una tendencia parecida al observado con el extracto óptimo, es decir, las mayores pérdidas se produjeron en el grupo de los flavanoles, mientras que los ácidos fenólicos y los flavonoles se vieron menos afectados por el proceso de digestión. Sin embargo, hay que destacar que las cantidades de flavanoles y ácidos fenólicos detectadas en el digerido del permeado fueron muy superiores a las detectadas en el digerido del extracto óptimo.

- *Actividad antioxidante.*

En la Figura 53 se muestran los resultados obtenidos respecto al valor TEAC del permeado durante el proceso de la digestión. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad antioxidante del permeado no se modificó de forma significativa a lo largo del proceso digestivo.

Del mismo modo, el análisis del contenido en compuestos fenólicos totales tras el proceso de la digestión puso de manifiesto que dicho valor tampoco varió tras el proceso de la digestión con respecto al valor inicial del extracto permeado (Figura 54).

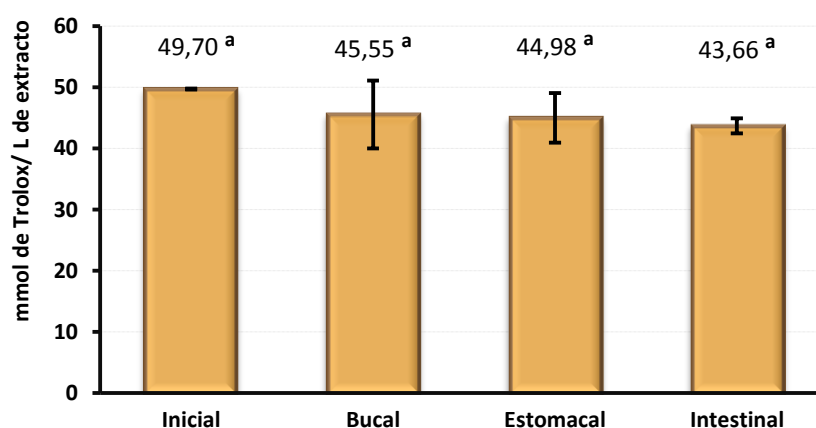


Figura 53. Valor TEAC del permeado de pepitas durante el proceso digestivo.

^{a,b} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

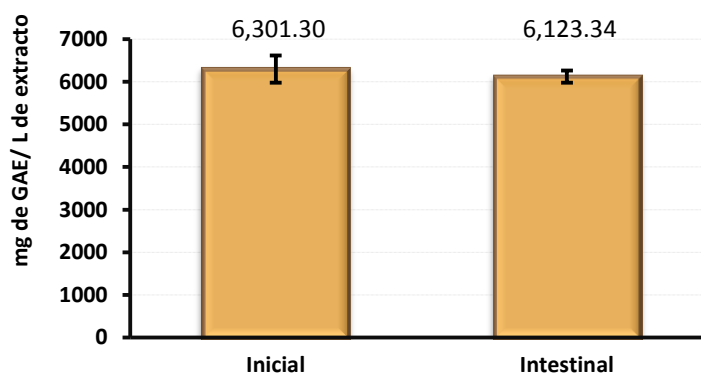


Figura 54. TPC al inicio y final del proceso digestivo.

Así, los datos obtenidos para el permeado resultaron ser diferentes a los obtenidos previamente para el extracto óptimo, lo que estaría relacionado con la ausencia de compuestos fenólicos poliméricos en el permeado. Además, estos datos corroboran los obtenidos en el caso del permeado de raspón, donde tampoco se encontró un descenso de la actividad antioxidante durante el proceso digestivo.

No obstante, cabe indicar que la actividad antioxidante del extracto óptimo de pepitas digerido resultó superior a la observada para el permeado de pepitas, a pesar del importante descenso en la actividad antioxidante que se observó en este extracto después del proceso digestivo.

3.3.3.3.2. Absorción intestinal.

Los datos obtenidos tras los ensayos de absorción intestinal del permeado digerido se muestran en la Tabla 38. La composición fenólica de la fracción biodisponible resultó similar a la mostrada para el extracto óptimo, aunque el permeado proporcionó, en general, una mayor biodisponibilidad de los distintos compuestos fenólicos identificados.

Los compuestos fenólicos mayoritarios en la fracción biodisponible fueron nuevamente los flavanoles, principalmente en forma de epicatequina (10 %) y de catequina (10 %), aunque también se encontraron cantidades importantes del dímero B₂ y en menor medida del galato de epicatequina y el dímero B₁. Respecto al resto de compuestos fenólicos, destacó la presencia de ácido vainílico y ácido gálico.

Tabla 38. Absorción intestinal de los compuestos fenólicos presentes en la fase intestinal (mg de compuesto/L de extracto).

			EXTRACTO PERMEADO DE PEPITAS		
			Digerido	Apical	Basolateral
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	54,79 ± 5,14	36,17 ± 0,09	2,54 ± 0,04
		Ácido Protocatéquico	0,41 ± 0,04	Coeluye	0,07 ± 0,01
		Monogaloil glucósido	23,30 ± 1,62	20,19 ± 1,04	1,73 ± 0,42
		Ácido Vainfllico	Nd	Nd	3,53 ± 0,19
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	0,83 ± 0,02	Coeluye	0,36 ± 0,00
		Ácido p-Cumárico	1,78 ± 0,04	1,05 ± 0,04	0,53 ± 0,02
		Ácido 3-Cumárico	0,55 ± 0,08	0,53 ± 0,04	Trazas
FLAVONIODES	FLAVANÓLES	Catequina	1212,64 ± 45,01	758,53 ± 128,99	119,46 ± 0,82
		Epicatequina	1251,36 ± 41,86	884,45 ± 8,35	126,97 ± 1,15
		Galato de catequina	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,03 ± 0,00
		Galato de epicatequina	54,92 ± 4,11	28,21 ± 0,25	8,73 ± 0,18
		Dímero B1	169,10 ± 6,04	133,43 ± 0,87	13,94 ± 0,14
		Dímero B2	225,02 ± 7,91	252,55 ± 4,51	31,02 ± 0,76
		Dímero A2	10,06 ± 1,02	5,84 ± 0,08	1,26 ± 0,05
	FLAVONÓLES	Quercetina-3-O-glucuronido	0,69 ± 0,08	0,78 ± 0,04	Trazas
		Quercetina-3-O-glucósido	2,70 ± 0,08	1,97 ± 0,02	0,91 ± 0,00
		Quercetina	Nd	Nd	Nd
OTROS	OTROS	Áldehido Protocatéquico	Nd	Nd	Nd
		Ácido Elágico	Nd	Nd	Nd

La actividad antioxidante (Figura 55) determinada en la fracción biodisponible tras el proceso de absorción intestinal mostró un valor de 3,13 mmol de trolox/L de extracto, por lo que el permeado supondría un aumento importante de la actividad antioxidante en dicha fracción, resultando notablemente superior al determinado para el digerido del extracto óptimo de pepitas (1,82 mmol de trolox/L de extracto).

Asimismo, en la fracción biodisponible del permeado se determinó un TPC (Figura 56) con un valor de 489,75 mg de GAE/L de extracto, correspondiente al 10,67 % de la actividad antioxidante presente en el digerido. Este valor indica que la cantidad total de compuestos fenólicos biodisponibles aportados por el permeado de pepitas era notablemente superior a la aportada por el extracto óptimo (342,48 mg de GAE/L de extracto).

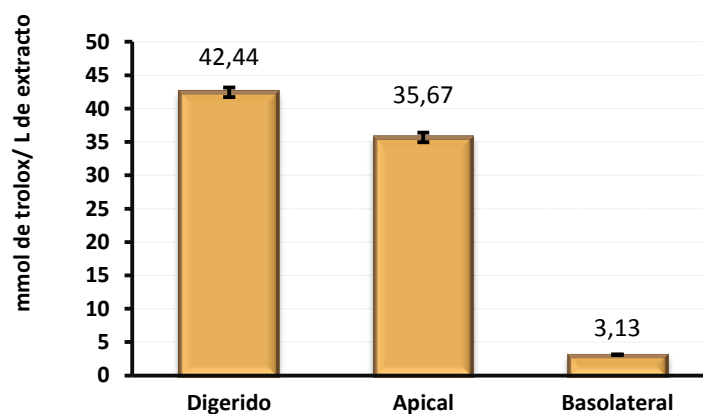


Figura 55. Valor TEAC en la fracción biodisponible tras seis horas de absorción intestinal.

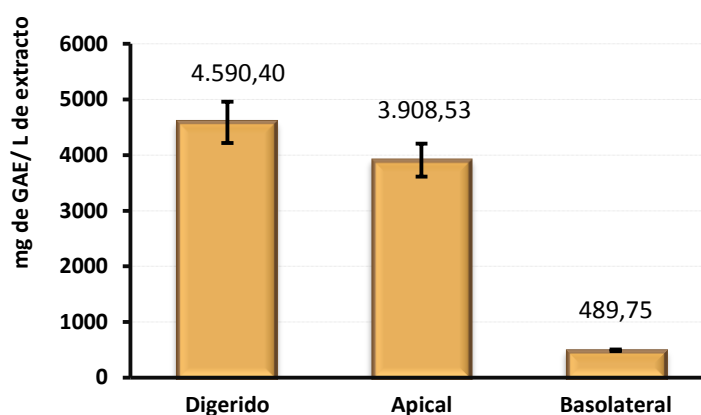


Figura 56. TPC en la fracción biodisponible tras seis horas de absorción intestinal.

En este sentido, aunque el extracto óptimo de pepitas posea un contenido superior en compuestos fenólicos totales, estos eran principalmente polímeros por lo que en el proceso digestivo dichos polímeros precipitan conjuntamente con las enzimas de este proceso o son degradados por las mismas, y resultan además, no absorbibles en el intestino por su elevado tamaño molecular. Este hecho provoca que el permeado, rico en monómeros y oligómeros que se ven menos afectados por el proceso digestivo y pueden ser absorbidos por el intestino, presente una cantidad mayor de compuestos fenólicos biodisponibles y una mayor actividad antioxidante.

Con todo ello, puede concluirse que el proceso de ultrafiltración permite obtener un extracto de pepitas con una mayor biodisponibilidad comparado con la de su extracto original, al lograr obtener un mayor contenido de compuestos monoméricos y oligoméricos en el extracto digerido.

3.4. Hollejos.

3.4.1. Desazucarado de los hollejos.

Teniendo en cuenta que los hollejos de uva presentan un importante contenido en azúcar, previamente a las extracciones PLE, se llevó a cabo un proceso de desazucarado. El principal objetivo de este proceso fue la extracción de la mayor cantidad de azúcares posibles con la menor pérdida de compuestos fenólicos. Así, a partir de los hollejos secos y sin moler, se extrajeron los azúcares empleando varios ciclos de extracción con agua Mili-Q a 4°C, monitorizándose la extracción de compuestos fenólicos durante cada ciclo.

El proceso de desazucarado aplicado a los hollejos se llevó a cabo hasta que el contenido de azúcares extraído fue residual. Asimismo, durante dicho proceso se produjo una pérdida mínima de los compuestos fenólicos presentes en los hollejos (datos no mostrados). De este modo, los hollejos, una vez desazucarados, se liofilizaron y se molieron para así llevar a cabo la extracción por PLE.

3.4.2. Extracción PLE de hollejos.

Para la obtención de los extractos de PLE a partir de los hollejos se utilizó el mismo diseño experimental descrito previamente para el raspón (Tabla 8). Las variables estudiadas en este diseño fueron el contenido de compuestos fenólicos totales, la actividad antioxidante (ABTS) y el porcentaje de color polimérico de los extractos.

El porcentaje de color polimérico es un método empleado para la determinación de los polímeros de antocianos. Este método se basa en la decoloración de los antocianos libres en presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, calculándose así el porcentaje que representan los polímeros de antocianos frente a la absorbancia total de la muestra a 520 nm (específica de antocianos), pudiendo dar una indicación de degradación térmica de antocianos.

Los resultados obtenidos para las distintas variables de este estudio se muestran en la Tabla 39. El análisis estadístico de los datos reveló que los resultados obtenidos no se ajustaron al modelo de regresión cuadrática propuesto para ninguna de las variables estudiadas. Sin embargo, sí pudo detectarse una cierta tendencia de los datos obtenidos, observándose un claro efecto de la temperatura. De este modo, el incremento de la temperatura supuso un aumento en todas las variables estudiadas, mientras que el etanol

y el tiempo ejercieron un efecto en dichas variables cuando se consideran en conjunto con la temperatura.

Tabla 39. Matriz del diseño experimental, indicando los valores experimentales obtenidos para las diferentes variables dependientes.

Exp	Rendimiento	TPC	ABTS	Color Polimérico
	(g extracto/ 100 g hollejos)	(mg GAE/ g extracto)	(mmol Trolox/ g extracto)	(%)
1	38,20	16,79	0,99	36,96
2	38,48	18,68	0,90	41,98
3	42,02	45,14	1,46	50,88
4	40,34	27,61	1,04	47,22
5	38,90	34,65	0,99	43,19
6	34,42	11,87	0,64	40,66
7	47,66	65,01	1,69	54,44
8	36,74	20,47	0,95	35,59
9	38,76	26,94	0,87	40,13
10	46,08	23,14	0,71	56,01
11	33,32	13,77	0,74	40,61
12	55,38	70,48	1,78	61,13
13	42,54	36,21	1,29	45,57
14	45,82	36,43	1,28	48,54
15	45,26	39,00	1,32	48,55
16	44,5	37,22	1,31	47,34
17	44,22	42,24	1,31	45,72
18	42,96	38,89	1,24	45,95
19	42,84	39,56	1,29	50,72

Con respecto a la actividad antioxidante de los extractos y su contenido total en compuestos fenólicos, se observó que existía una buena correlación entre ambos, con una $R = 0,9445$ (Figura 57). Este resultado es similar al registrado en los apartados anteriores.

De este modo, al no existir ajuste con respecto al modelo propuesto para ninguna de las variables estudiadas, se decidió llevar a cabo un pequeño estudio comparativo entre diversos experimentos del diseño. Así, se seleccionaron dos extractos generados a temperaturas diferentes, ya que como se comentó anteriormente, se observó una cierta tendencia para este factor. En este sentido se comparó el extracto generado en las condiciones del experimento 14 con respecto a las del experimento 5, ambos con un TPC y actividad antioxidante próximos. El extracto generado a la mayor temperatura

(n° 12) se descartó al presentar un elevado porcentaje de color polimérico, lo cual indica una mayor extracción de antocianos poliméricos o una degradación de los monómeros.

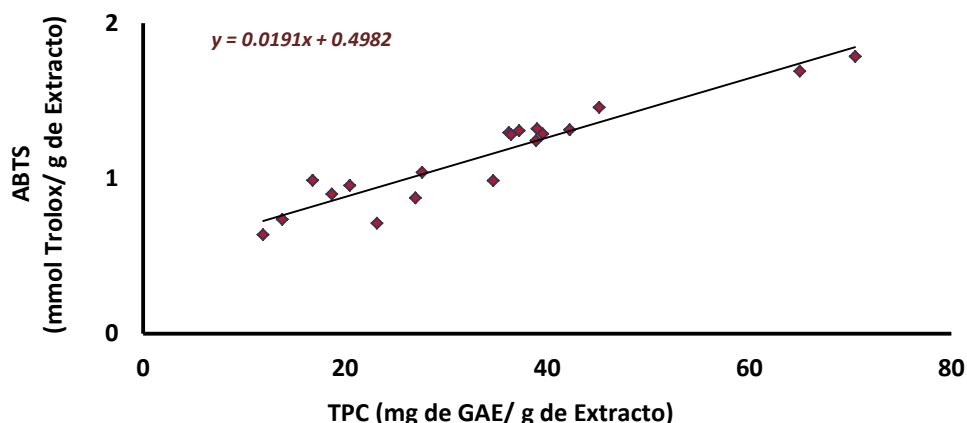


Figura 57. Gráficos de correlación para el TPC y valor TEAC (ABTS) de los 19 extractos PLE de hollejos del diseño experimental ($p=0,0001$).

El análisis del perfil fenólico de los extractos, según su grado de polimerización, indicó que el extracto del experimento 14 mostraba tan solo un ligero aumento de monómeros y oligómeros con respecto al del experimento 5, mientras que los polímeros fenólicos del primero prácticamente se duplicaban con respecto al segundo (datos no mostrados), coincidiendo así con el efecto de la temperatura sobre los polímeros que se observa en la bibliografía (Bucić-Kojić y col., 2009).

Por lo tanto, la extracción de los hollejos se llevó a cabo utilizando un 20 % de etanol, 56°C y 6 minutos, coincidiendo con la extracción n°5 del diseño experimental. En estas condiciones se obtiene el mayor valor de TPC a temperaturas inferiores a 60 °C, a la vez que se minimiza la extracción de los polímeros fenólicos, los cuales, como se ha demostrado en capítulos anteriores, no son biodisponibles.

Al observar los datos existentes en la bibliografía acerca de los extractos de hollejos se corrobora, igual que sucede en este estudio, que el contenido en compuestos fenólicos de los mismos es pequeño y especialmente bajo si se compara con las pepitas o raspones (Koźmiński y Oliveira-Brett, 2008). Con todo ello, los valores de actividad antioxidante y TPC de este estudio resultaron superiores a los obtenidos por PLE con etanol, metanol o agua a partir de hollejos de otras variedades (Polovka y col., 2010; Šťavíková y col., 2011). Así, aunque hay que considerar las posibles variaciones de carácter intervarietal e intravarietal, ampliamente comentadas en esta memoria, estos resultados ponen

nuevamente de manifiesto, que las mezclas de etanol y agua resultan más eficaces que las extracciones PLE llevadas a cabo con solo uno de ellos.

3.4.3. Caracterización del extracto de hollejos.

3.4.3.1. Caracterización química.

Tal y como puede observarse para este extracto (Tabla 40), sus compuestos mayoritarios fueron los flavonoides, principalmente antocianos, aunque los flavanoles y flavonoles constituían una fracción importante del mismo.

Entre los antocianos, el compuesto más abundante resultó ser la malvidina-3-O-glucósido, el cual representaba a casi la mitad de los compuestos pertenecientes a este grupo. Los flavanoles identificados fueron tanto monómeros como dímeros, donde destacan la catequina y epicatequina, aunque también se encontraron cantidades importantes de los dímeros B₁ y B₂. La composición del extracto en flavonoles se caracterizó principalmente por derivados de quercetina, donde el derivado glucurónido resultó ser el más abundante, seguido del derivado glucosilado y en menor medida, de la forma galactósida.

En la muestra también se identificaron diversos ácidos fenólicos, tanto hidroxibenzoicos como hidroxicinámicos, donde los hidroxibenzoicos resultaron ser los compuestos principales de este grupo. En este sentido, los compuestos mayoritarios fueron el ácido sirínico y el ácido vainílico, aunque también resultó destacable el contenido en ácido caftárico.

Todos los compuestos identificados en este extracto han sido previamente descritos tanto para extractos de Merlot como para los obtenidos a partir de otras variedades (Montealegre y col., 2006; Di Lecce y col., 2014). Asimismo, la composición de flavanoles del extracto se encuentra en el intervalo de valores descritos para extractos de hollejos de esta variedad (Chira y col., 2009), mientras que tanto el perfil de los antocianos como su contenido coincide con lo determinado para otras variedades (Košir y col., 2004).

Tabla 40. Composición fenólica del extracto de hollejos (μg de compuesto/g de extracto).

		EXTRACTO DE HOLLEJOS	
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	28,21 \pm 4,65
		Ácido Protocatéquico	1,97 \pm 0,62
		Monogaloil glucósido	0,07 \pm 0,01
		Ácido Vainílico	203,07 \pm 27,29
		Ácido 2,3-Dihidroxibenzoico	49,16 \pm 0,63
		Ácido Sirínico	307,59 \pm 0,96
		Ácido Elágico	5,41 \pm 0,46
		Aldehído Protocatéquico	Trazas
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	74,36 \pm 1,68
		Ácido Cafeico	5,96 \pm 0,16
		Ácido p-Cumárico	2,56 \pm 0,54
	*EST	Trans-Resveratrol	Coeluye
FLAVONOIDES	FLAVANOLAS	Catequina	617,78 \pm 30,98
		Epicatequina	490,12 \pm 88,40
		Galato de epicatequina	69,77 \pm 10,73
		Dímero B1	182,36 \pm 7,58
		Dímero B2	337,14 \pm 18,17
	FLAVONOLES	Hiperósido	118,99 \pm 9,11
		Rutina	34,71 \pm 4,32
		Quercetina-3-O-glucuronido	785,44 \pm 103,20
		Quercetina-3-O-glucósido	614,54 \pm 39,34
		Quercetina	0,51 \pm 0,34
		Kaempferol	3,74 \pm 0,39
		Isorhamnetina (3-metoxi-quercetina)	14,04 \pm 0,31
	ANTOCIANOS	Delfinidín-3-O-glucósido	120,84 \pm 2,49
		Cianidina-3-O-glucósido	85,81 \pm 2,71
		Malvidina-3-O-glucósido	1858,47 \pm 110,53
		Derivado de cianidina	488,88 \pm 32,05
		Derivados de petunidina	231,64 \pm 14,15
		Antocianos no identificados	928,80 \pm 31,29

*EST (*Estilbenos*).

La determinación de los compuestos fenólicos poliméricos totales se llevó a cabo tal y como se describió en el apartado del raspón. Además, mediante este método se cuantificó el contenido en polímeros de antocianos monitorizando la absorbancia a 520 nm. Por su parte, la cuantificación de las proantocianidinas totales se llevó a cabo por el método de la vainillina.

La caracterización de las proantocianidinas del extracto de hollejos se muestra en la Tabla 41. Dichas proantocianidinas estaban compuestas mayoritariamente por unidades monoméricas de extensión de epicatequina y de catequina. Por el contrario, las unidades terminales resultaron ser principalmente de epicatequina, y en menor medida, de galato de epicatequina, conteniendo cantidades especialmente bajas de catequina. De este modo, tan solo el 7 % de las unidades monoméricas se presentaron en formas galoiladas. Así, la elevada proporción de unidades de extensión frente a las unidades terminales indicó un grado de polimerización medio (mDP) equivalente a $25,35 \pm 3,60$ unidades, con un peso molecular medio equivalente a $7348,17 \pm 1038,5$.

Tabla 41. Caracterización fenólica de la fracción de proantocianidinas poliméricas del extracto óptimo de pepitas.

Composición Fenólica (%)						
Unidades Terminales			Unidades de Extensión			
Catequina	Epicatequina	Galato de Epicatequina	Catequina	Epicatequina	Galato de Epicatequina	Epigallocatequina
0,16	2,59	1,24	25,54	57,31	5,63	7,54

Por su parte, el contenido total de compuestos fenólicos poliméricos resultó equivalente a $8,37 \pm 0,47$ mg de catequina/g de extracto, de los cuales el contenido en polímeros de antocianos correspondía a aproximadamente 5 mg de malvidina/g de extracto. Así, estos datos coinciden con los determinados por el método de la vainillina, donde se indica que la fracción de proantocianidinas era equivalente a $4,29 \pm 1,37$ mg de catequina/g de extracto.

Los datos encontrados para las proantocianidinas coinciden con los indicados previamente por otros autores, aunque para este estudio, la composición en monómeros galoilados resultó ligeramente superior (Souquet y col., 2000; Bordiga y col., 2011).

Si se compara la composición fenólica del extracto de hollejos con respecto a la del raspón y las pepitas, pueden observarse diferencias importantes entre ellos. Así, el extracto de hollejos se caracterizó por una composición principalmente de antocianos, seguida por flavanoles y flavonoles, mientras que, los extractos de pepitas y raspón carecen de antocianos y se caracterizaron por estar compuestos principalmente por flavanoles, y en menor medida de ácidos fenólicos y flavonoles.

En cuanto a la composición de flavanoles, el extracto de hollejos coincidió con el de raspón al tener la catequina como el monómero principal, mientras que al igual que en el de pepitas, la procianidina B₂ se mostró como el principal dímero. Además, el perfil de flavonoles del extracto de hollejos resultó similar al del raspón, caracterizado por diversos compuestos derivados de la quercetina, donde el principal fue la quercetina-3-O-glucurónido, seguido posteriormente por la forma glucosilada.

Sin embargo, a diferencia de lo observado para los extractos de raspón y pepitas, en el extracto de hollejos el ácido gálico no fue el ácido fenólico mayoritario, mostrando un contenido notablemente superior de ácido vainílico.

Con respecto al contenido total de proantocianidinas del extracto de hollejos, resulta importante indicar que dicho contenido resultó notablemente inferior al de los extractos de raspón y de pepitas. Asimismo, el mDP de las proantocianidinas de hollejos resultó más elevado que los datos obtenidos para los otros dos extractos mientras que el contenido en monómeros galoilados fue inferior.

3.4.3.2. Biosdisponibilidad.

3.4.3.2.1. Digestión in vitro.

- Composición fenólica.

Cuando se estudia el efecto de la digestión sobre la composición de los monómeros y oligómeros del extracto (Tabla 42) se pudo observar que durante la etapa bucal no se producen cambios importantes en la composición del mismo, mientras que la etapa estomacal e intestinal resultaron críticas en su composición.

El efecto de la digestión sobre los compuestos fenólicos del extracto mostró un perfil similar al observado para los extractos etanólicos de las uvas tintas. En este sentido, al final de la digestión se produjo un aumento del ácido sirínico y del p-cumárico, tal y como se indicó en el apartado de las uvas. El resto de los ácidos fenólicos se vieron poco afectados por la digestión. Del mismo modo, se observó una disminución prácticamente total de todos los flavanoles durante la etapa estomacal. Por su parte, los flavonoles presentaron pérdidas de entre el 23- 55 % del contenido inicial.

Tabla 42. Composición fenólica del extracto de hollejos durante el proceso digestivo (mg de compuesto/L de extracto).

			EXTRACTO DE HOLLEJOS			
			Inicial	Bucal	Estomacal	Intestinal
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	0,846 ± 0,140 ^a	0,720 ± 0,011 ^a	Coeluye	Coeluye
		Ácido Protocatéquico	0,059 ± 0,019 ^a	0,066 ± 0,002 ^a	Coeluye	0,043 ± 0,000 ^b
		Monogaloil glucósido	0,002 ± 0,000 ^a	0,003 ± 0,0002 ^a	Trazas	Nd
		Ácido 2,3-Dihidroxibenzoico	1,475 ± 0,019 ^a	1,364 ± 0,036 ^b	Nd	Nd
		Ácido Vainíllico	6,092 ± 0,819 ^a	5,846 ± 0,061 ^a	Coeluye	Coeluye
		Ácido Siríngico	9,228 ± 0,566 ^c	8,486 ± 0,189 ^c	36,089 ± 0,185 ^a	21,008 ± 0,400 ^b
		Aldehído Protocatéquico	Trazas	Trazas	Coeluye	Coeluye
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	2,231 ± 0,050 ^a	2,308 ± 0,004 ^a	1,862 ± 0,028 ^b	1,757 ± 0,010 ^c
		Ácido Cafeico	0,179 ± 0,008 ^a	0,182 ± 0,003 ^a	Trazas	Nd
Ácido p-Cumárico		0,077 ± 0,013 ^c	0,068 ± 0,005 ^c	0,385 ± 0,011 ^b	0,551 ± 0,112 ^a	
FLAVONOIDES	FLAVANOL	Catequina	18,53 ± 0,929 ^a	19,639 ± 0,108 ^a	Trazas	Nd
		Epicatequina	14,704 ± 2,652 ^a	13,340 ± 0,612 ^a	Trazas	Nd
		Galato de epicatequina	2,093 ± 0,322 ^a	1,943 ± 0,032 ^a	Trazas	Nd
		Dímero B1	5,471 ± 0,227 ^a	5,597 ± 0,133 ^a	Trazas	Nd
		Dímero B2	10,114 ± 0,545 ^a	10,504 ± 0,216 ^a	Trazas	Nd
	FLAVONOL	Hiperósido	3,570 ± 0,273 ^a	3,448 ± 0,022 ^a	1,673 ± 0,045 ^b	1,609 ± 0,091 ^b
		Rutina	1,041 ± 0,129 ^a	1,098 ± 0,033 ^a	0,422 ± 0,018 ^c	0,807 ± 0,000 ^b
		Quercetina-3-O-glucuronido	23,563 ± 3,096 ^a	22,030 ± 0,064 ^a	10,091 ± 0,084 ^c	14,895 ± 0,574 ^b
		Quercetina-3-O-glucósido	18,436 ± 1,181 ^a	19,277 ± 0,132 ^a	13,432 ± 0,010 ^b	11,491 ± 0,793 ^c
		Quercetina	0,015 ± 0,010 ^b	0,012 ± 0,009 ^b	0,025 ± 0,001 ^a	Trazas
		Kaempferol	0,112 ± 0,012 ^a	0,111 ± 0,006 ^a	Nd	Nd
		Isorhamnetina	0,421 ± 0,009 ^b	0,477 ± 0,004 ^a	Nd	Nd
	ANTOCIANOS	Delfinidín-3-O-glucósido	3,625 ± 0,0075 ^b	4,298 ± 0,135 ^a	2,726 ± 0,019 ^c	Trazas
		Cianidín-3-O-glucósido	2,574 ± 0,081 ^b	2,845 ± 0,042 ^a	2,542 ± 0,022 ^b	0,315 ± 0,077 ^c
		Malvidín-3-O-glucósido	55,754 ± 3,316 ^b	62,453 ± 1,065 ^a	48,488 ± 0,019 ^c	3,141 ± 1,073 ^d
		Derivado de cianidina	14,66 ± 0,96 ^b	16,46 ± 0,48 ^a	14,44 ± 0,007 ^b	1,36 ± 0,056 ^c
		Derivados de petunidina	7,76 ± 0,43 ^a	8,21 ± 0,07 ^a	1,66 ± 0,016 ^b	1,07 ± 0,055 ^c
		Antocianos no identificados	27,86 ± 0,935 ^b	31,59 ± 0,25 ^a	13,41 ± 0,039 ^c	2,88 ± 0,078 ^d

^{a,b,c,d} Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

El comportamiento de los antocianos también fue similar al de los extractos de uvas tintas, encontrándose un importante descenso durante el proceso digestivo de este tipo de compuestos. En este sentido, tras la etapa estomacal se observó tan solo una pequeña reducción, mientras que la pérdida fue intensa tras la etapa intestinal, siendo por tanto crítica dicha etapa para estos compuestos debido al cambio de pH, tal y como comentó en el apartado de las uvas.

De esta forma, los datos observados confirman los obtenidos para el extracto etanólico de uvas tintas, donde se observa un importante descenso de flavanoles y una reducción casi total de los antocianos, a partir de los cuales se producen incrementos de ciertos ácidos fenólicos. Resulta importante indicar que la cantidad de ácidos fenólicos que se detectaron en el digerido del extracto de hollejos fue en general, similar a los detectados para el extracto etanólico de las uvas de Merlot, sin embargo, este último digerido presentaba una mayor cantidad de flavonoides, especialmente de flavanoles.

A su vez, los resultados obtenidos de la digestión del extracto de hollejos confirman los obtenidos previamente para los extractos óptimos de raspón y pepitas. En este sentido, los flavanoles redujeron su contenido tras el proceso digestivo, tal y como se ha indicado con anterioridad. Del mismo modo, los ácidos fenólicos y los flavonoles fueron más resistentes a dicho proceso. Además, resulta importante indicar que tras el proceso digestivo se observa el incremento y aparición de ciertos picos no identificados, tanto para el extracto de hollejos como para el de las uvas de Merlot.

- *Actividad antioxidante.*

El efecto de la digestión sobre la actividad antioxidante del extracto de hollejos se muestra en la Figura 58. Durante la etapa bucal no se produjeron cambios significativos en dicha actividad. Por el contrario, durante la etapa estomacal se observó un descenso de la actividad antioxidante, que se mantiene durante la etapa intestinal. Con todo ello, tras el proceso digestivo se produjo un descenso total de la actividad del extracto equivalente al 25 % del valor inicial.

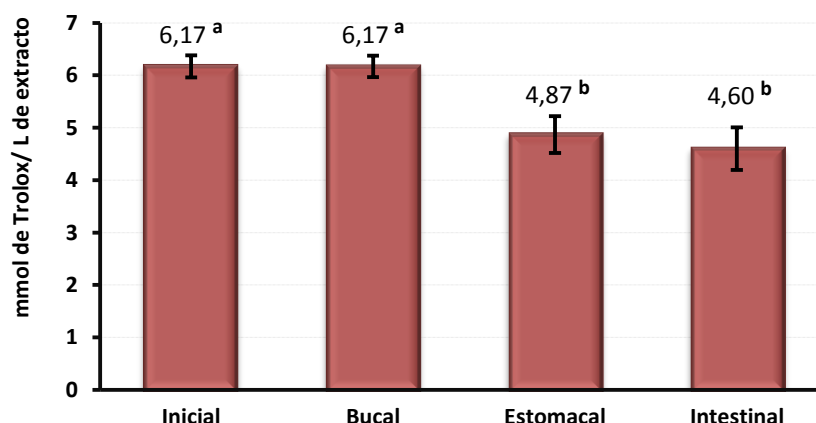


Figura 58. Actividad antioxidante del extracto de hollejos durante el proceso digestivo por el método de DPPH. ^{a,b}Diferentes letras muestran diferencias significativas por el análisis de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tras el proceso digestivo se produjo una pérdida del 29 % de los compuestos fenólicos totales presentes en el extracto (Figura 59).

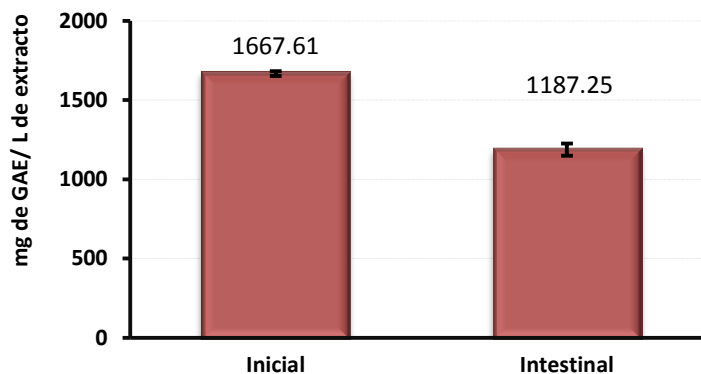


Figura 59. TPC al inicio y final del proceso digestivo.

Este descenso de actividad antioxidante del extracto de hollejos tras la digestión, coincidió con lo obtenido previamente para el extracto etanólico de las uvas de la variedad Merlot (26 %), corroborando así estos datos.

3.4.3.2.2. Absorción intestinal

La absorción intestinal de los compuestos fenólicos presentes en el digerido del extracto de hollejos se muestra en la Tabla 43.

Los resultados obtenidos indican que la fracción biodisponible estaba compuesta principalmente de ácidos fenólicos, donde destaca el ácido sirínico y en menores cantidades el ácido vainílico y el ácido gálico. Junto a estos ácidos, también se encontraron derivados de la quercetina, destacando la quercetina-3-O-glucurónido y quercetina-3-O-glucósido, así como pequeñas cantidades de antocianos y de hiperósido.

Estos resultados resultan similares a los obtenidos durante la absorción intestinal a partir del digerido del extracto etanólico de Tannat (único extracto de uvas cuya absorción se ha estudiado).

Del mismo modo, mientras que el digerido del extracto etanólico de Tannat no aportó antocianos a la fracción biodisponible, con el extracto de hollejos se absorbieron pequeñas cantidades de los mismos, donde se observó la presencia de la malvidina-3-O-glucósido y de derivados de la cianidina y petunidina. Así, estos datos coinciden con los observados previamente por otros autores, donde se indica que la absorción de los

antocianos es especialmente pequeña, con valores inferiores al 5 % del contenido inicial (Manach y col., 2005).

Tabla 43. Absorción intestinal de los compuestos fenólicos presentes en la fase intestinal a través de un modelo celular Caco-2 (mg de compuesto / L de extracto).

		EXTRACTO DE HOLLEJOS		
		Digerido	Apical	Basolateral
ÁCIDOS FENÓLICOS	BENZOICOS	Ácido Gálico	Coeluye	Coeluye
		Ácido Protocatéquico	0,043 ± 0,000	0,011 ± 0,003
		Monogaloil glucósido	Nd	Nd
		2,3-Dihidroxibenzoico	Nd	Nd
		Ácido Vainílico	Coeluye	Coeluye
		Ácido Sirínico	21,008 ± 0,400	14,594 ± 0,893
		Aldehído Protocatéquico	Coeluye	Nd
	CINÁMICOS	Ácido Caftárico	1,757 ± 0,010	0,386 ± 0,043
		Ácido Cafeico	Nd	Nd
		Ácido p-Cumárico	0,551 ± 0,112	0,583 ± 0,017
FLAVONOIDES	FLAVANOLAS	Catequina	Nd	Nd
		Epicatequina	Nd	Nd
		Galato de epicatequina	Nd	Nd
		Dímero B1	Nd	Nd
		Dímero B2	Nd	Nd
	FLAVONOLES	Hiperósido	1,609 ± 0,091	0,911 ± 0,025
		Rutina	0,807 ± 0,000	0,150 ± 0,009
		Quercetina-3-O-glucuronido	14,895 ± 0,574	10,992 ± 0,276
		Quercetina-3-O-glucósido	11,491 ± 0,793	4,021 ± 1,694
		Quercetina	Trazas	Nd
		Kaempferol	Nd	Nd
		Isorhamnetina	Nd	Nd
	ANTOCIANOS	Delfinidín-3-O-glucósido	Trazas	Nd
		Cianidín-3-O-glucósido	0,315 ± 0,077	Nd
		Malvidín-3-O-glucósido	3,141 ± 1,073	0,144 ± 0,034
		Derivado de cianidina	1,36 ± 0,056	0,144 ± 0,034
		Derivados de petunidina	1,07 ± 0,055	0,31 ± 0,112
		Antociano no identificado - 2	2,88 ± 0,078	Trazas

Además, se determinó la actividad antioxidante de la fracción biodisponible, en la que se observó un valor equivalente a 0,59 mmol de trolox/L de extracto (Figura 59). Asimismo, tras el proceso de absorción intestinal, en la fracción biodisponible se

observó un 23 % de los compuestos fenólicos totales presente inicialmente en el digerido (251,96 mg de GAE/L de extracto) (Figura 60).

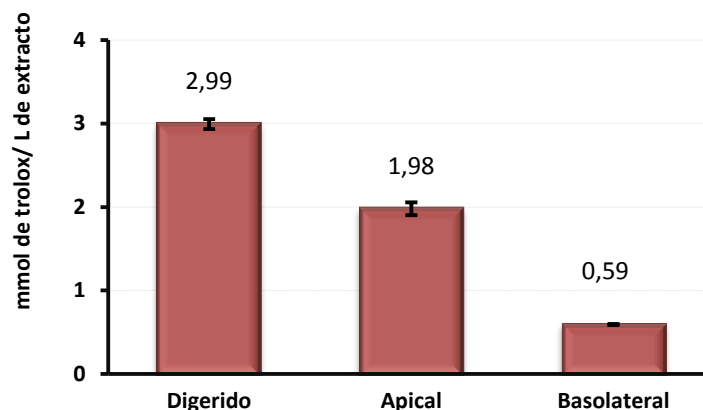


Figura 59. Valor TEAC en la fracción biodisponible tras seis horas de absorción intestinal.

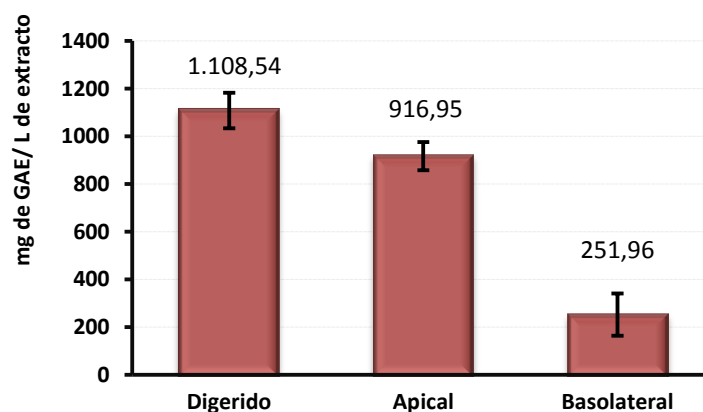


Figura 60. TPC en la fracción biodisponible tras seis horas de absorción intestinal.

Debido a que el extracto de hollejos presentaba en origen un bajo contenido en compuestos fenólicos y que además los polímeros fenólicos suponían una parte importante del extracto, se decidió no llevar a cabo el estudio del permeado de hollejos, ya que el enriquecimiento en monómeros sería muy limitado.

3.4.4. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos a partir de subproductos de la uva.

La fracción biodisponible de todos los extractos de este estudio presentó una actividad antioxidante y una cierta cantidad de compuestos fenólicos. Sin embargo, tanto la cantidad de estos compuestos como la actividad antioxidante detectada fueron diferentes para cada extracto, lo que corrobora la existencia de un efecto de la matriz sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos.

Así, de todos los extractos estudiados en este trabajo, el denominado óptimo de pepitas era el que poseía, en origen, un contenido superior en compuestos fenólicos totales, seguido del denominado extracto óptimo de raspón. Sin embargo, en ambos casos, una gran parte de esos compuestos fenólicos era de naturaleza polimérica, los cuales sufren una precipitación/modificación durante el proceso digestivo, resultando además, no absorbibles en el intestino por su elevado tamaño molecular. Todo esto provoca que la fracción biodisponible de estos extractos, que poseían en origen un elevado contenido en compuestos fenólicos y una importante actividad antioxidante, presente un contenido en compuestos fenólicos mucho menor. Sin embargo, hay que indicar que la fracción biodisponible del extracto óptimo de pepitas sigue presentando un mayor contenido en TPC y una mayor actividad antioxidante que la del extracto óptimo de raspón debido a su mayor contenido en monómeros y oligómeros, principalmente flavanoles y en menor medida, ácidos fenólicos.

Estos resultados dan lugar a que en este trabajo se planteara la utilización de estrategias que permitieran aumentar el contenido en monómeros y oligómeros de los extractos, reduciendo su contenido en polímeros. Así, por un lado se procedió a la ultrafiltración de los extractos óptimos de pepita y raspón a través de una membrana de 10 KDA lo que dió lugar a la obtención de dos permeados, de pepita y de raspón, ricos en monómeros y oligómeros. Estos permeados, al carecer de polímeros, presentan, en origen, tanto una actividad antioxidante como un TPC mucho menor que sus respectivos extractos originales, aunque en este caso, la pérdida de TPC durante la digestión es reducida. En este sentido, la fracción biodisponible del permeado de pepitas presenta un mayor TPC y una mayor actividad antioxidante que la de su extracto de partida, al mostrar un mayor contenido de compuestos monoméricos y oligoméricos en el extracto digerido. Sin embargo, la fracción biodisponible del permeado de raspón no presenta un mayor contenido de TPC con respecto a la obtenida en el caso del extracto óptimo de raspón, ya que en este caso el digerido de ambos extractos presenta un contenido similar en monómeros y oligómeros.

Otra estrategia utilizada para trabajar con extractos ricos en monómeros y oligómeros consistió en buscar, dentro de los diferentes extractos llevados a cabo para la realización de los diseños, alguno con estas características. Esto sólo se pudo conseguir para el caso del raspón donde el experimento 10 (100 % etanol, 80 °C, 6 minutos) presentaba una cantidad de polímeros notablemente inferior a la que mostraba el extracto óptimo. Así,

aunque dicho extracto etanólico presentaba en origen un menor TPC que el extracto óptimo, su fracción biodisponible contiene una cantidad muy superior en TPC que la que presenta dicho extracto óptimo. En este sentido, en la fracción biodisponible del extracto etanólico destacan un mayor contenido en flavanoles, principalmente de catequina, y de trans-resveratrol, junto con otros compuestos como el ácido gálico o el ácido sirínico. Por todo ello, se puede concluir que los compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico de raspón presentan una mayor biodisponibilidad que los presentes tanto en el extracto óptimo de raspón como en el permeado y por tanto este extracto sería el más adecuado de cara al desarrollo de alimentos enriquecidos con este tipo de compuestos.

Por otra parte, los extractos obtenidos a partir de los hollejos presentan una composición bastante similar a los extractos etanólicos procedentes de las uvas, con un elevado contenido en antocianos. Estos extractos poseen una cantidad de polímeros inferior a la obtenida para los extractos de pepitas y de raspón y su contenido en TPC y su actividad antioxidante también es menor. Para este extracto se observó igualmente, una importante pérdida de actividad antioxidante durante la digestión, que podría achacarse a la pérdida de polímeros fenólicos, como sucedía para el raspón y pepitas. Además, es importante resaltar que dicho proceso afecta de modo muy importante a los antocianos. La cantidad de TPC en la fracción biodisponible de estos extractos es menor si se compara con la aportada por los extractos pepitas y similar a la registrada en el óptimo de raspón.



4

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

1. Respecto a las 26 variedades de uva estudiadas: Viognier, seguida de Albariño y Chenin Blanc constituyen las variedades de uva blanca con mayor contenido en compuestos fenólicos antioxidantes, mientras que en las tintas los mejores resultados correspondieron a la variedad Tannat y, en menor medida, a Merlot y Garró.
2. Los extractos de Viognier, Tannat, Merlot y Garró resultan adecuados para la formulación de vinos o bebidas saludables capaces de aportar antioxidantes biodisponibles, donde el extracto obtenido a partir de Tannat sería, en este caso, el más adecuado para dicho propósito.
3. La extracción con líquidos presurizados de compuestos fenólicos antioxidantes a partir de raspón y pepitas se ajustó al modelo experimental propuesto, donde el porcentaje de etanol:agua resultó ser el factor más significativo seguido de la temperatura. Así, las pepitas constituyen la mejor fuente tanto de monómeros y oligómeros como de polímeros fenólicos.
4. El proceso de digestión de los extractos obtenidos a partir de subproductos provocó una importante disminución en el contenido en compuestos fenólicos antioxidantes debido principalmente a la precipitación y/o modificación de su fracción polimérica.
5. La fracción biodisponible que presenta un mayor contenido en compuestos fenólicos antioxidantes es la correspondiente al extracto óptimo de pepitas, ya que tras el proceso digestivo es la que presenta una mayor cantidad de compuestos fenólicos bioaccesibles, principalmente flavanoles y en menor medida ácidos fenólicos.

6. Tanto el extracto de pepitas como el de raspón presentaron una destacada actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación mediada por LDLox, lo que puede estar relacionado con la alta actividad antioxidante que presentan estos extractos.
7. El contenido en compuestos fenólicos antioxidantes de los permeados permaneció estable durante el proceso de digestión, corroborando que durante dicho proceso los polímeros son los compuestos fenólicos que se ven más afectados. Además, el permeado de pepitas presentó una mayor cantidad de compuestos fenólicos biodisponibles que el extracto de pepitas, aunque no ocurrió lo mismo para el caso del raspón.
8. Respecto a los extractos obtenidos a partir de raspón, el estudio de su biodisponibilidad pone de relieve que no solo es importante la obtención de un extracto con un alto contenido en monómeros y oligómeros y pobre en polímeros sino la composición general de la matriz.
9. Para la formulación de alimentos saludables enriquecidos en compuestos fenólicos los estudios de biodisponibilidad resultan imprescindibles ya que, en la práctica, nos permiten evaluar cuál es la mejor fuente de este tipo de compuestos. Como se ha puesto de manifiesto a lo largo de esta memoria no siempre los extractos caracterizados con un mayor contenido en compuestos fenólicos son los que proporcionarían un mayor nivel de absorción de los mismos.

4. Conclusions

1. Regarding to the 26 wine grape varieties studied: Viognier, followed by Albariño and Chenin Blanc are the white grape varieties with the highest content in antioxidant phenolic compounds, whereas red varieties with the most satisfactory results concerned to Tannat variety, and to a lesser extent, to Merlot and Garró.
2. The extracts obtained from Viognier, Tannat, Merlot and Garró were suitable for wines or health beverages formulation able to provide bioavailable antioxidants, being Tannat extract in this study the more appropriated to attain this purpose.
3. Pressurized liquid extraction applied to obtain antioxidant phenolic compounds from stem and seeds fits with the proposed experimental design, where percentage of ethanol:water was the main meaningful factor followed by temperature. In such away, grape seeds constitute the best source of both monomeric-oligomeric and polymeric phenolic compounds.
4. Digestive process caused an important decrease in the content of antioxidant phenolic compounds of the winemaking by-products extracts, mainly due to the precipitations/modifications phenomena of the polymeric phenolic fraction.
5. The bioavailable fraction with the highest antioxidant phenolic content concerned to the grape seed extract obtained in the optimal conditions, since after digestive process this extract contains a larger amount of bioavailable compounds, mainly flavanols and to a lesser extent, phenolic acids.
6. Grape seed and stem extracts obtained both in optimal conditions showed a remarkable anti-inflammatory activity in a LDLox mediated inflammatory model, probably due to their high antioxidant activity.
7. The antioxidant phenolics content of the permeates obtained by ultrafiltration remains stable throughout the digestive process, bearing out that polymeric phenolic compounds are the main affected compounds during this process. Furthermore, grape seed permeate contained a higher bioavailable phenolic

compounds than the original optimal extract, although this was not occurring with the stem extract.

8. Concerning the stem extracts, the bioavailability study highlights the significance of the matrix, concluding that both to obtain a high monomeric-oligomeric and poor polymeric content in the extract and the global phenolic composition have to be taken into account.
9. Bioavailability studies resulted absolutely necessary to formulate healthy food products enriched with phenolic compounds, since it allows us to know the most suitable source of this kind of compounds. As has shown along this dissertation the phenolic extracts characterized by the highest content of this compounds not always supply a higher absorption level of them.



5

BIBLIOGRAFÍA

5. Bibliografía

Alén-Ruiz, F.; García-Falcón, M.S.; Pérez-Lamela, M.C.; Martínez-Carballo E. y Simal-Gándara, J. (2009). Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chem.*, 11, 53-60.

Alonso-Borbalán, A.M.; Zorro, L.; Guillén, D.A. y Barroso, C.G. (2003). Study of polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *J. Chromatogr. A.*, 1012, 31-38.

Alonso-Salces, R.M.; Korta, E.; Barranco, A.; Berrueta, L.A.; Gallo, B. y Vicente, F. (2001). Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in Apple. *J. of Chromatogr. A*, 933, 37-43.

Álvarez-Suárez, J.M.; Tulipani, S.; Diaz, D.; Estevez, Y.; Romandini, S.; Giampieri, F.; Damiani, E.; Astolfi, P.; Bompadre, S. y Battino, M.M.A.B. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 2490-2499.

Anastasiadi, M.; Choraniapoulus, N.G.; Nychas, G.J.E. y Haroutounian, S.A. (2009). Antilisterial Activities of Polyphenol-Rich Extracts of Grapes and Vinification Byproducts. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 457-463.

Anastasiadi M.; Pratsinis H.; Kletsas D.; Skaltsounis A. y Haroutounian S.A. (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT - Food Sci. Technol.* 48(2):316-322.

Anli, R.E. y Vural, N. (2009). Antioxidant phenolic substances of Turkish red wines from different wine regions. *Molecules*. 14, 289-297.

Aquilano, K.; Baldelli, S.; Rotilio, G. y Ciriolo, M.R. (2008). Role of Nitric Oxide Synthases in Parkinson's Disease: A Review on the Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Polyphenols. *Neurochem. Res.*, 33, 2416-2426.

Arai, S. (1996). Studies on functional foods in Japan-state of the art. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 9-15.

Arapitsas, P.; Speri, G.; Angeli, A.; Perenzoni, D. y Mattivi, F. (2014). The influence of storage on the "chemical age" of red wines. *Metabolomics*, 10, 816-832.

Arapitsas, P. y Turner, C. (2008). Pressurized solvent extraction and monolithic column-HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage. *Talanta*, 74, 1218-1223.

Arcari, S.G.; Chaves, E.S.; Vanderlinde, R.; Rosier, J.P. y Bordigon-Luiz, M.T. (2013). Brazilian fortified wines: Chemical composition, chromatic properties and antioxidant activity. *Food Res. Int.*, 53, 164-173.

Arnous, A.; Makris, D.P. y Kefalas, P. (2001). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5736-5742.

Balasundram, N.; Sundram, K. y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.*, 99,191-203.

Barros A.; Gironés-Vilaplana, A.; Teixeira, A.; Collado-González, J.; Moreno, D.A.; Gil-Izquierdo, A.; Rosa, E. y Domínguez-Perles, R. (2014). Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study. *Food Res. Int.*, 65 (0), 375-384.

Basu, A.; Du, M.; Leyva, M.J.; Sanchez, K.; Betts, N.M.; Wu, M.; Aston, C.E. y Lyons, T.J. (2010). Blueberries Decrease Cardiovascular Risk Factors in Obese Men and Women with Metabolic Syndrome. *J. Nutr.*, 140, 1582–1587.

Baydar, N.G.; Özkan, G. y Yaşar, S. (2007). Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, 18, 1131–1136.

Bech-Larsen, T. y Scholderer, J. (2007). Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. *Trends Food Sci. Technol.*, 18, 231-234

Bell, J.R.C.; Donovan, J.L.; Wong, R.; Waterhouse, A.L.; German, J.B.; Walzem, R.L. y Kasim-Karakas, S.E. (2000). (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 103–108.

Bigliardi, B. y Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 31, 118-119

Bognar, E.; Sarzegi, Z.; Szabol, A.; Debrecenil, B.; Kalman, N.; Tucsek, Z.; Sumegil, B. y Gallyas, F. (2013). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects in RAW264.7 Macrophages of Malvidin, a Major Red Wine Polyphenol. *Plos ONE*, (8), 1-11.

Boido, E.; García-Mariano, M.; Dellacassa, E.; Carrau, F.; Rivas-Gonzalo, J.C. y Escribano-Bailón, M.T. (2011). Characterisation and evolution of grape polyphenol profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat during ripening and vinification. *Aust. J. Grape Wine R.*, 17, 383–393.

Bordiga, M.; Travaglia, F.; Locatelli, M.; Coisson, J.D. y Arlorio, M. (2011). Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chem.*, 127, 180–187.

Brand-Williams, W.; Cuveleir, M. E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol-Leb.*, 28 (1), 25-30.

Breksa, A.P.; Takeoka, G.R.; Hidalgo, M.B.; Vilches, A.; Vasse, J. y Ramming, D.W. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selection. *Food Chem.* 121, 740-745.

Bub, A.; Watzl, B.; Heeb, D.; Rechkemmer, G. y Briviba, C. (2001). Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *Eur. J. Nutr.*, 40, 113–120.

Bucić-Kojić, A.; Plančić, M.; Tomas, S.; Jakobek, L. y Šeruga, M. (2009). Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 44, 2394-2401.

- Bulotta, S.;** Celano, M.; Lepore, S.M.; Montalcini, T.; Pujia, A. y Russo, D. (2014). Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *J. Transl. Med.*, 12, 210-219.
- Burns, J.;** Gardner, P.T.; Mathewa, D.; Duthie, G.G.; Lean, M.E.J. y Crozier, A. (2001). Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5797-5808.
- Cáceres-Mella, A.;** Flores-Valdivia, D.; Laurie, V.F.; López-Solís, R. y Peña-Neira, A. (2014). Chemical and Sensory Effects of Storing Sauvignon Blanc Wine in Colored Bottles under Artificial Light. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 7255-7262.
- Çam, M. y** Hışıl, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chem.*, 123, 878-885.
- Cao, G.;** Russell, R.M.; Lischner, N. y Prior, R.L. (1998). Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J. Nutr.* 128, 2383-2390.
- Carabias-Martínez, R.;** Rodríguez-Gonzalo, E.; Revilla-Ruiz, P. y Hernández-Méndez, J. (2005). Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J. Chromatogr. A.*, 1089, 1-17.
- Castilla, P.;** Echarri, R.; Dávalos, A.; Cerrato, F.; Ortega, H.; Teruel, J.L.; Fernández Lucas, M.; Gómez-Coronado, D.; Ortuño, J. y Lasunción, M.A. (2006). Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 84, 252- 62.
- Castillo-Muñoz, N.;** Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E. y Hermosín-Gutiérrez, I. (2010). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *J. Food Compos. Anal.*, 23, 699-705.
- Cerezo, A.B.;** Tesfaye, W.; Soria-Díaz, M.E.; Torija, M.J.; Mateo, E.; García-Parrilla, M.C. y Troncoso, A.M. (2010). Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing. *J. Food Compos. Anal.*, 23 (2), 175-184.
- Chabane, N.M.;** Al Ahmad, A.; Peluso, J.; Muller, C.D. y Ubeaud, G. (2009). Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, 61 (11), 1473-83.
- Chamorro, S.;** Viveros, A.; Alvarez, I.; Vega, E. y Brenes, A. (2012). Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. *Food Chem.*, 133, 308-314.
- Chen, J.;** Qin, S.; Xiao, J.; Tanigawa, S.; Uto, T.; Hashimoto, F.; Fujii, M. y Hou, D.-X. (2011). A Genome-Wide Microarray Highlights the Antiinflammatory Genes Targeted by Oolong Tea Theasinensin A in Macrophages. *Nutrition and Cancer*, 63 (7), 1064-1073.
- Chen, G.-L.;** Hu, K.; Zhong, N.-J.; Guo, J.; Gong, Y.-S.; Deng, X.-T.; Huang, Y.-S.; Chu, D.-K. y Gao, Y.-Q. (2013). Antioxidant capacities and total polyphenol content of nine commercially available tea juices measured by an in vitro digestion model. *Eur. Food Res. Technol.*, 236, 303-310.

Chira, K.; Schmauch, G.; Saucier, C.; Fabre, S. y Teissedre, P.-L. (2009). Grape Variety Effect on Proanthocyanidin Composition and Sensory Perception of Skin and Seed Tannin Extracts from Bordeaux Wine Grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for Two Consecutive Vintages (2006 and 2007). *J. Agric. Food Chem.*, 57, 545–553.

Chiou, A.; Karathanos, V.T.; Mylona, A.; Salta, F.N.; Preventi, F. y Andrikopoulos, N.K. (2007). Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chem.* 102, 516-522.

Cho, M.J.; Howard, L.R.; Prior, R.L. y Clark, J.R. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agr.* 84, 1771-1782.

Choy, Y.Y.; Jaggers, G.K.; Oteiza, P.I. y Waterhouse, A.L. (2013). Bioavailability of Intact Proanthocyanidins in the Rat Colon after Ingestion of Grape Seed Extract. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 121–127.

Chukwumah, Y.; Walker, L.; Vogler, B. y Verghese, M. (2011). In Vitro Absorption of Dietary trans-Resveratrol from Boiled and Roasted Peanuts in Caco-2 Cells. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 12323–12329.

Cordero-Herrera, I.; Martín, M.A.; Goya, L. y Ramos, S. (2015). Cocoa flavonoids protect hepatic cells against high-glucose-induced oxidative stress: Relevance of MAPKs. *Mol. Nutr. Food Res.*, 59, 597–609

Corrales, M.; Fernandez, A.; Vizoso Pinto M.G.; Butz, P. y Franz, C.M.A.P.; Schuele, E. y Tauscher, B. (2010). Characterization of phenolic content, in vitro biological activity, and pesticide loads of extracts from white grape skins from organic and conventional cultivars. *Food and Chem. Toxicol.*, 48, 3471–3476.

Ćurko, N.; Ganić, K.K.; Gracin, L.; Đapić, M.; Jourdes, M. y Teissedre, P.L. (2014). Characterization of seed and skin polyphenolic extracts of two red grape cultivars grown in Croatia and their sensory perception in a wine model medium. *Food Chem.*, 145, 15–22

Da Porto, C.; Porretto, E. y Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason. Sonochem.*, 20, 1076–1080.

Dani, C.; Oliboni, L.S.; Vanderlinde, R.; Bonatto, D.; Salvador, M. y Henriques, J.A.P. (2007). Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically -or conventionally- produced grapes. *Food Chem. Toxicol.*, 45, 2574-2580.

Daudt, C.E. y Fogaça, A.O. (2013). Phenolic compounds in Merlot wines from two wine regions of Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Sci. Technol.*, 33 (2), 355-361.

Davalli, P.; Rizzi, F.; Caporali, A.; Pellacani, D.; Davoli, S.; Bettuzzi, S.; Brausi, M. y D'Arca, D. (2012). Anticancer activity of green tea polyphenols in prostate gland. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2012, 1-18.

- De Beer, D.;** Joubert, E.; Gelderblom, W.C.A. y Manley, M. (2003). Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 902-909.
- De Sá, M.;** Justino, V.; Spranger, M.I.; Zhao, Y.Q.; Hanc, L.; Sun, B. (2014). Extraction Yields and Anti-oxidant Activity of Proanthocyanidins from Different Parts of Grape Pomace: Effect of Mechanical Treatments. *Phytochem. Anal.*, 25, 134-140.
- Delgado-Torre, M.P.;** Ferreira-Vera, C.; Priego-Capote, F.; Pérez-Juan, P.M. y Luque de Castro, M.D. (2012). Comparison of Accelerated Methods for the Extraction of Phenolic Compounds from Different Vine-Shoot Cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 3051-3060.
- Devesa-Rey, R.;** Vecino, X.; Varela-Alende, J.L.; Barral, M.T.; Cruz, J.M. y Moldes, A.B. (2011). Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Manage.* 31(11): 2327-2335.
- Deprez, S.;** Mila, I.; Huneau, J.F.; Tome, D. y Scalbert, A. (2001). Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid. Redox Sign.*, 3, 957-967.
- Di Lecce, G.;** Arranz, S.; Jáuregui, O.; Tresserra-Rimbau, A.; Quifer-Rada, P. y Lamuela-Raventós, R.M. (2014). Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole mass spectrometry. *Food Chem.*, 145, 874-882.
- Di Majo, D.;** La Guardia, M.; Giammanco, S.; La Neve, L. y Giammanco, M. (2008). The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chem.*, 111, 45-49.
- Domínguez-Perles, R.;** Teixeira, A.; Rosa, E. y Barros, A. (2014). Assessment of (poly)phenols in grape (*Vitis vinifera* L.) stems by using food/pharma industry compatible solvents and response surface methodology. *Food Chem.*, 164, 339-346.
- Downey, M.O.;** Dokoozlian, N.K. y Krstic, M.P. (2005). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grape and wine: A review of recent research. *Am. J. of Enol. Viticult.*, 57, 257-268.
- Du, G.;** Li, M.; Ma, F. y Liang, D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits. *Food Chem.*, 113, 557-562.
- EC 2003.** Proposal for a Regulation of the European Parliament and the Council on the nutrition and health claims made on foods. Bruselas. p. 16.7.2003 COM. 424-final
- Echeverry, C.;** Ferreira, M.; Reyes-Parada, M.; Abin-Carriquiry, J.A.; Blasina, F.; González-Neves, G. y Dajas, F. (2005). Changes in antioxidant capacity of Tannat red wines during early maturation. *J. Food Eng.*, 69, 147-154.
- Eriz, G.;** Sanhueza, V.; Roeckel, M. y Fernández, K. (2011). Inhibition of the angiotensin-converting enzyme by grape seed and skin proanthocyanidins extracted from *Vitis vinífera* L. cv. País. K. *LWT-Food Sci. Technol.*, 44, 860-865.

Esposito, E.; Rotilio, D.; Di Matteo, V.; Di Giulio, C.; Cacchio, M. y Algeri, S. (2002). A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol. Aging*, 23, 719–735.

Estruch, R.; Sacanella, E.; Badia, E.; Antúnez, E.; Nicolás, J.M.; Fernández-Solá, J.; Rotilio, D.; de Gaetano, G.; Rubin, E.; Urbano-Márquez, A. (2004). Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis*, 175, 117–123.

Favre, G.; Peña-Neira, A.; Baldi, C.; Hernández, N.; Traverso, S.; Gil, G. y González-Neves, G. (2014). Low molecular-weight phenols in Tannat wines made by alternative winemaking procedures. *Food Chem.*, 158, 504–512.

Flanzy, C. (2003). Vinificación por maceración carbónica. En Flanzy, C. (coord.): *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos* (2ª edición) (págs.478-484). A.M.V. Ediciones y Mundi-Prensa (Madrid).

Fernández, K. y Labra, J. (2013). Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chem.*, 139, 196–202.

Fernández-Pachón, M.S.; Villano, D.; Garcia-Parrilla, M.C y Troncoso, A.M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal. Chim. Acta.*, 513, 113-118.

Ferrazzano, G.F.; Amato, A.; Ingenito, A.; De Natale, A. y Pollio, A. (2009). Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia*, 80, 252-262.

Figueiredo-González, M.; Regueiro, J.; Cancho-Grande, B. y Simal-Gándara, J. (2014). Garnacha Tintorera-based sweet wines: Detailed phenolic composition by HPLC/DAD–ESI/MS analysis. *Food Chem.*, 143, 282–292.

Fotakis, C.; Christodouleas, D.; Zervou, M.; Papadopoulos, K. y Calokerinos, A.C. (2012). Classification of wine based on different antioxidant responses to spectrophotometric analytical methods. *Anal. Lett.*, 45: 581–591.

Fuhrman, B.; Volkova, N.; Coleman, R. y Aviram, M. (2005). Grape Powder Polyphenols Attenuate Atherosclerosis Development in Apolipoprotein E Deficient (E0) Mice and Reduce Macrophage Atherogenicity. *J. Nutr.*, 135, 722–728.

Fuhrman, B.; Partoush, A.; Volkova, N. y Aviram, M. (2008). Ox-LDL induces monocyte-to-macrophage differentiation *in vivo*. Possible role for the macrophage colony stimulating factor receptor (M-CSF-R). *Atherosclerosis*, 196, 598-607.

Furiga, A.; Lonvaud-Funel, A. y Badet, C. (2009). In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. *Food Chem.*, 113, 1037–1040.

- García-Marino, M.;** Rivas-Gonzalo, J.C.; Ibáñez, E. y García-Moreno, C. (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Anal. Chim. Acta*, 563, 44–50.
- García-Muñoz, C. y** Vaillant, F. (2014). Metabolic Fate of Ellagitannins: Implications for Health, and Research Perspectives for Innovative Functional Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 54, 1584–1598
- Gee, J.M.;** DuPont, M.S.; Rhodes, M.J.C. y Johnson, I. (1998). Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 19–25.
- Gharas, H.E.** (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44 (12), 2512–2518.
- Giusti, M. M. y** Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of Anthocyanins with UV-visible Spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: Wiley. Unidades F1.2.1-13.
- Goldberga, D.M.;** Yanb, J. y Soleas, G.J. (2003). Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin. Biochem.*, 36, 79–87.
- González, R.;** Ballester, I.; López-Posadas, R.; Suárez, M.D.; Zarzuela, A.; Martínez-Agustín, O. y Sánchez de Medina, F. (2011). Effects of Flavonoids and other Polyphenols on Inflammation. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.*, 51, 331–362.
- González-Centeno, M.R.;** Rosselló, C.; Simal, S.; Garau, M.C.; López, F. y Femenia, A. (2010). Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *LWT–Food Sci. Technol.*, 43 (10), 1580-1586.
- González-Centeno, M.R.;** Jourdes, M.; Femenia, A.; Simal, S.; Rosselló, C. y Teissedre, P.L. (2012). Proanthocyanidin Composition and Antioxidant Potential of the Stem Winemaking Byproducts from 10 Different Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 60 (48), 11850–11858.
- González-Neves, G.;** Barreiro, L.; Gila, G.; Franco, J.; Ferrer, M.; Moutounet, M. y Carbonneau, A. (2004). Anthocyanic composition of Tannat grapes from the south region of Uruguay. *Anal. Chim. Acta*, 513, 197–202.
- González-Neves, G.;** Franco, J. y Barreiro, L. (2007). Varietal differentiation of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and wines according to their anthocyanic composition. *Eur. Food Res. Technol.*, 225, 111–117.
- González-Neves, G.;** Gil, G.; Barreiro, L. y Favre, G. (2010). Pigment profile of red wines cv. Tannat made with alternative winemaking techniques. *J. Food Compos. Anal.*, 23, 447–454.
- González-Neves, G.;** Gil, G.; Favre, G. y Ferrer, M. (2012). Influence of grape composition and winemaking on the anthocyanin composition of red wines of Tannat. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 47, 900–909.

Gramza, A.; Korczak, J. y Amarowicz, R. (2005). Tea polyphenols – their antioxidant properties and biological activity- A review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 14 (55), 219–235.

Granato, D.; Katayama, F.C.U. y de Castro, I.A. (2010). Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chem.*, 129, 366-373.

Green, R.J.; Murphy, A.S.; Schulz, B.; Watkins, B.A. y Ferruzzi, M.G. (2007). Common tea formulations modulate *in vitro* digestive recovery of green tea catechins. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 1152-1162.

Gris, E.F.; Mattivi, F.; Ferreira, E.A.; Vrhovsek, U.; Pedrosa, R.C. y Bordignon-Luiz, M. (2011). Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines. *Food Chem.*, 126, 213–220.

Gupta, R.K.; Patel, A.K.; Shah, N.; Chaudhary, K.A.; Jha, U.K.; Yadav, U.C.; Gupta, P.K. y Pakuwal, U. (2014). Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15, 4405-4409.

Halliwell, B.; Aeschbach, R; Löliger, J. y Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, 33, 601-617.

Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R. y Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13, 572-584.

Helal, A.; Tagliazucchi, D.; Verzelloni, E. y Conte, A. (2014). Bioaccessibility of polyphenols and cinnamaldehyde in cinnamon beverages subjected to *in vitro* gastro-pancreatic digestion. *J. Funct. Foods*, 7, 506-507.

Henning, S.M.; Zhang, Y.; Rontoyanni, V.G.; Huang, J.; Lee, R.-P.; Trang, A.; Nuernberger, G. y Heber, D. (2014). Variability in the Antioxidant Activity of Dietary Supplements from Pomegranate, Milk Thistle, Green Tea, Grape Seed, Goji, and Acai: Effects of *in Vitro* Digestion. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 4313–4321

Henry-Vitrac, C.; Desmoulière, A.; Girard, D.; Mérillon, J.M. y Krisa, S. (2006). Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur. J. Nutr.*, 45, 376–382.

Herrero, M.; Cifuentes, A. e Ibáñez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chem.*, 98, 136-148.

Herrero, M.; Castro-Puyana, M.; Mendiola, J.A. e Ibáñez, E. (2013). Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *Trends Anal. Chem.*, 43, 67-83.

Hogan, S.; Zhang, L.; Li, J.R.; Zoecklein, B. y Zhou, K. (2009). Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. *Food Sci. and Technol.*, 42, 1269-1274.

Hollebeeck, S.; Winand, J.; Herent, M.-F.; During, A.; Leclercq, J.; Larondelle; Y. y Schneider, Y.-J. (2012). Anti-inflammatory effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) husk ellagitannins in Caco-2 cells, an *in vitro* model of human intestine. *Food Funct.*, 3, 875.

- Hosu, A.;** Cristea, V.-M. y Cimpoiu, C. (2014). Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chem.*, 150, 113–118.
- Hu, X.-T.;** Ding, C.; Zhou, N. y Xu, C. (2015). Quercetin protects gastric epithelial cell from oxidative damage in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, 754, 115–124.
- Huang, D.J.;** Ou, BX; Hampsch-Woodill, M, Flanagan, J.A. y Prior, R.L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agrci. Food Chem.* 50, 4437-4444.
- Huang, H.;** Sun, Y.; Lou, S.; Li, H. y Ye, X. (2014). In vitro digestion combined with cellular assay to determine the antioxidant activity in Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) fruits: A comparison with traditional methods. *Food Chem.*, 146, 363–370.
- Iacopini, P.;** Baldi, M.; Storchi, P. y Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J. Food Compos.*, 21, 589-598.
- Ioannone, F.;** Di Mattia, C.D.; De Gregorio, M; Sergi, M.; Serafini, M. y Sacchetti, G. (2015). Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. *Food Chem.*, 174 (2), 56-62.
- Ivanova, V.;** Stefova, M. y Vojnoski, B. (2009). Assay of the phenolic profile of Merlot wines from Macedonia: effect of maceration time, storage, SO₂ and temperature of storage. *Macedonian Journal of Chemistry and Clinical Engineering.*, 28 (2), 141-149.
- Jensen, J.S.;** Demiray, S.; Egebo, M. y Meyer, A. (2008). Prediction of Wine Color Attributes from the Phenolic Profiles of Red Grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.*, 56, 1105–1115.
- Johnson, I.T.;** Williamson, G. y Musk, S.R. (1994). Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients. *Nutr. Res. Rev.*, 7, 175–204
- Jones, P.J. y Jew, S.** (2007). Functional food development: concept to reality. *Trends Food Sci. Techno.*, 18, 387–390.
- Kaldas, M.I.;** Walle, U.K. y Walle, T. (2003). Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, 55, 307-312.
- Kalili, K.M.;** Vestner, J.; Stander, M.A. y Villiers, A. (2013). Toward Unravelling Grape Tannin Composition: Application of Online Hydrophilic Interaction Chromatography × Reversed-Phase Liquid Chromatography–Time-of-Flight Mass Spectrometry for Grape Seed Analysis. *Anal. Chem.*, 85, 9107–9115.
- Kallithraka, S.;** Salacha, M.I. y Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chem.*, 113, 500-505.

Karvela, E.; Makris, D.P.; Kalogeropoulos, N. y Karathanos, V.T. (2009). Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta*, 79, 1311–1321.

Karvela, E.; Makris, D.P.; Kalogeropoulos, N. y Karathanos, V.T. (2011). Deployment of response surface methodology to optimize recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem and seed polyphenols. 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11). *Procedia Food Science*, 1, 1686 – 1693.

Katalinić, V.; Možina, S.S.; Skroza, D.; Generalić, I.; Abramović, H.; Miloš, M.; Ljubenkov, I.; Piskernik, S.; Terpinč, P. y Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.*, 119, 715–723.

Khan, M.K.; Zill-E-Huma y Dangles, O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J. Food Compos. Anal.*, 33, 85–104.

Kiassos, E.; Mylonaki, S.; Makris, D.P. y Kefalas, P. (2009). Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. *Innov. Food Sci. Emerg Technol.*, 10, 246–252.

Kilmister, R.L.; Mazza, M.; Baker, N.K.; Faulkner, P. y Downey, M.O. (2014). A role for anthocyanin in determining wine tannin concentration in Shiraz. *Food Chem.*, 152, 475–482.

Kolodziejczyk, K.; Sojka, M.; Abadias, M.; Vinas, I.; Guyot, S. y Baron, A. (2013). Polyphenol composition, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of the extracts obtained from industrial sour cherry pomace. *Ind. Crop. Prod.*, 51, 279–288.

Kondrashov, A.; Sevsick, R; Benáková, H; Kostrítov y M, Stipek, S. (2009). The key role of the grape variety from antioxidant capacity of red wines. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 4, 41–46.

Konishi, Y.; Kobayashi, S. y Shimizu, M. (2003). Transepithelial Transport of p-Coumaric Acid and Gallic Acid in Caco-2 Cell Monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (11), 2317–2324.

Košir, I.J.; Lapornik, B.; Andrenšek, S.; Wondra, A.G.; Vrhovšek, U. y Kidrič, J. (2004). Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Anal. Chim. Acta*, 18, 277–282.

Koźmiński, P. y Oliveira-Brett, A.M. (2008). Anthocyanin monitoring in four red grape skin extract varieties using RP-HPLC-ED. *Anal. Lett.*, 41 (4), 662–675.

Krook, M.A. y Hagerman, A.E. (2012). Stability of polyphenols epigallocatechin gallate and pentagalloyl glucose in a simulated digestive system. *Food Res. Inter.*, 49, 112–116.

Lachman, J.; Hejtmánková, A.; Hejtmánková, K.; Horníčková, S.; Pivec, V.; Skala, O.; Dědina, M. y Příbyl, J. (2013). Towards complex utilisation of winemaking residues:

Characterisation of grape seeds by total phenols, tocopherols and essential elements content as a by-product of wine making. *Ind. Crop Prod.*, 49, 445–453.

Landis-Piwowar, K.R.; Huo, C.; Chen, D.; Milacic, V.; Shi, G.; Chan, T.H. y Dou, Q.P. (2007). A novel prodrug of the green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent. *Cancer Res.*, 67, 4303–4310.

Landrault, N.; Poucheret, P.; Ravel, P.; Gasc, F.; Cros, G. y Teissendré, P.L. (2001). Antioxidant capacities and phenolic levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3341–3348.

Larrauri, J.A.; Sanchez-Moreno, C.; Ruperez, P. y Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines. *J. Agric. Food Chem.*, 4, 1603–1606.

Laufenberg, G.; Kunz, B. y Nystroem, M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresour. Technol.*, 87, 167–198

Laurent, C.; Besançon, P. y Caporiccio, B. (2007). Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Food Chem.*, 100, 1704–1712.

Li, H.; Wang, X.; Li, P. y Wang, H. (2009). Phenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chem.* 112, 454–460.

Li, Y.; Skouroumounis, J.K.; Elsey, G.M. y Taylor, D.K. (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chem.*, 129, 570–576.

Li, A.-N.; Li, S.; Zhang, Y.-J.; Xu, X.-R.; Chen, Y.-M. y Li, H.-B. (2014). Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*, 6, 6020–6047.

Liang, L.; Wu, X.; Zhao, T.; Zhao, J.; Li, F.; Zou, Y.; Mao, G. y Yang, L. (2012). In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Res. Int.*, 46, 76–82.

Llobera, A. y Canellas, J. (2007). Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chem.*, 101, 659–666.

Llobera A. Study on the Antioxidant Activity of Grape Stems (*Vitis vinifera*). (2012). A Preliminary Assessment of Crude Extracts. *Food and Nutrition Sciences*, 3 (4): 500–504.

Lorenzo, J.M.; González-Rodríguez, R.M.; Sánchez, M.; Amado, I.R. y Franco, D. (2013). Effects of natural (grape seed and chestnut extract) and synthetic antioxidants (butylatedhydroxytoluene, BHT) on the physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of dry cured sausage “chorizo”. *Food Res. Int.*, 54, 611–620.

Lorrain, B.; Chira, K. y Teissendré, P.-L. (2011). Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chem.*, 126, 1991–1999.

Lucena, A.P.S.; Nascimento, R.J.B.; Maciel, J.A.C.; Tavares, J.X.; Barbosa-Filho, J.M. y Oliveira, E.J. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of selected Brazilian wines. *J. Food Compos. Anal.*, 23, 30-36.

Luque-Rodríguez, J.; Pérez-Juan, P. y Luque de Castro, M. D. (2006). Extraction of polyphenols from vine shoots of *Vitis vinifera* by superheated ethanol-water mixtures. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 8775-8781.

Lyons, M. M.; Yu, C.; Toma, R. B.; Cho, S. Y.; Reiboldt, W.; Lee, J. y Breemen, R.B. (2003). Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *J. of Agric. Food Chem.*, 51 (20), 5867-5870.

Mahmoud, M.Y. (2013). Natural Antioxidants Effect of Mulberry Fruits (*Morus nigra* and *Morus alba* L.) On Lipids Profile and Oxidative Stress in Hypercholestrolemic Rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12, 665-672.

Maier-Salamon, A.; Hagenauer, B.; Wirth, M.; Gabor, F.; Szekeres, T. y Jäger, Walter. (2006). Increased transport of resveratrol across monolayers of the human intestinal Caco-2 cells is mediated by inhibition and saturation of metabolites. *Pharma. Res-Dordr.*, 23, 2107-2115.

Makris, D.P.; Boskou, G. y Andrikopoulos, K. (2007). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Techno.*, 98, 2963-2967.

Makris, D.P.; Boskou, G. y Andrikopoulos, N.K. (2007b). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J. Food Compos. Anal.*, 20, 125-132.

Makris, D.P.; Boskou, G.; Andrikopoulos, N.K. y Kefalas, P. (2008). Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera* cv. Roditis) stems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.*, 226, 1075-1079.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. y Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 727-747.

Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A. y Rémésy, C., (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81 (suppl: 2), 30- 42.

Mandel, S. y Youdim, M.B.H. (2004). Catechins polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in degenerative diseases. *Free Radic. Biol. & Med.*, 37, 304 - 317.

Mantena, S.K.; Baliga, M.S. y Katiyar, S.K. (2006). Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 27, 1682-1691.

Martelo-Vidal, M. y Vázquez, M. (2014). Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV-VIS-NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chem.*, 158, 28-34.

Martin, D.; Nieto-Fuentes, J.A.; Señoráns, F.J.; Reglero, G. y Soler-Rivas, C. (2010). Intestinal digestion of fish oils and ω -3 concentrates under in vitro conditions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112, 1315-1322.

- Martínez, N.;** Casós, K.; Simonetti, P.; Sáiz, M.; Moreno, J.J. y Mitjavila, M.T. (2013). De-alcoholised white and red wines decrease inflammatory markers and NF- κ B in atheroma plaques in apoE-deficient mice. *Eur. J. Nutr.*, 52, 737–747
- Martínez-Ortega, M.V.;** García-Parrilla, M.C. y Troncoso, A.M. (2001). Changes in phenolic composition of wines submitted to in vitro dissolution test. *Food Chem.*, 73, 11-16.
- McDougall, G.J.;** Fyffe, S.; Dobson, P. y Stewart, D. (2005). Anthocyanins from red wine – Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*. 66, 2540-2548.
- Medzhitov, R.** (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454, 428-435.
- Méndez-Costabel, M.P.;** Wilkinson, K.L.; Bastian, S.E.P.; Jordans, C. y McCarthy, M. (2014). Effect of winter rainfall on yield components and fruit green aromas of *Vitis vinifera* L. cv. Merlot in California. *Aust. J. Grape Wine R.*, 20, 100–110.
- MINECO.** 2012. Guía para el aprovechamiento de subproductos de la pesca para la obtención de productos funcionales y bioactivos.
- Minussi, R.C.;** Rossi, M.; Bologna, L.; Rotillo, D.; Pastore, G.M. y Durán, N. (2007). Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 45, 102-107.
- Mitić, M.N.;** Obradovic, M.N.; Grahovac, Z.B. y Pavlovic, A.N. (2010). Antioxidant capacities and phenolic levels of different varieties of Serbian white wines. *Molecules*, 15, 2016-2027.
- Monagas, M.;** Garrido, I.; Bartolomé, B. y Gómez-Cordovés, C. (2006). Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. *Anal. Chim. Acta*, 563, 401–410.
- Montagut, G.;** Baiges, I.; Valls, J.; Terra, X.; del Bas, J.M.; Vitrac, X.; Richard, T.; Mérillon, J.-M.; Arola, L.; Blay, M.; Bladé, C.; Fernández-Larrea, J.; Pujadas, G.; Salvadó, J. y Ardévol, A. (2009). A trimer plus a dimer-gallate reproduce the bioactivity described for an extract of grape seed procyanidins. *Food. Chem.*, 116, 265–270.
- Montealegre, P.R.;** Peces, R.R.; Vozmediano, J.L.C.; Gascueña, J.M. y Romero, G. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Comp. Anal.*, 19, 687–693.
- Moon, J.H.;** Nakata, R.; Oshima, S.; Inakuma, T. y Terao, J. (2000). Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279, 461–467.
- Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
- Murota, K.;** Shimizu, S.; Chujo, H.; Moon, J.-H. y Terao, J. (2000). Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2. *Arch. Biochem. Biophys.*, 384, 391-397.

- Nathan, C.** (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420, 19-26.
- Naziri, E.;** Nenadis, N.; Mantzouridou, F.T. y Tsimidou, M.Z. (2014). Valorization of the major agrifood industrial by-products and waste from Central Macedonia (Greece) for the recovery of compounds for food applications. *Food Res. Int.*, 65, 350–358.
- Nehlig, A.** (2012). The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 75 (3), 716–727.
- Neilson, A.;** Hopf, A.; Cooper, B.; Pereira, M.A.; Bomser, J.A. y Ferruzzi, M.G. (2007). Catechin Degradation with Concurrent Formation of Homo- and Heterocatechin Dimers during in Vitro Digestion. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 8941–8949.
- Netzel, M.;** Strass, G.; Bitsch, I.; Könitz, R.; Christmann, M. y Bitsch, R. (2003). Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine. *J. Food Eng.* 56, 223–228.
- Noh, K.-H.;** Jang, J.-H.; Min, K.-H.; Chinzorig, R.; Lee, M.-O. y Song, Y.-S. (2011). Suppressive Effect of Green Tea Seed Coat Ethyl Acetate Fraction on Inflammation and Its Mechanism in RAW264.7 Macrophage Cell. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 40 (5), 625-634.
- Noguer, M.;** Cerezo, A.B.; Rentzsch, M.; Winterhalter, P.; Troncoso, A.M. y García-Parrilla, M.C. (2008). Simulated Digestion and Antioxidant Activity of Red Wine Fractions Separated by High Speed Countercurrent Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 8879–8884.
- Obrique-Slier, E.;** Peña-Neira, A. y López-Solís, R.; (2011). Precipitation of low molecular weight phenolic compounds of grape seeds cv. Carménère (*Vitis vinifera* L.) by whole saliva. *Eur. Food Res. Technol.*, 232, 113–121.
- Obrique-Slier, E.;** López-Solís, R.; Castro-Ulloa, L.; Romero-Díaz, C. y Peña-Neira, A. (2012). Phenolic composition and physicochemical parameters of Carménère, Cabernet Sauvignon, Merlot and Cabernet Franc grape seeds (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *LWT–Food Sci. Technol.*, 48, 134-141.
- Obrique-Slier, E.;** Peña-Neira, A.; López-Solís, R.; Cáceres-Mella, A.; Toledo-Aray, H. y López-Rivera, A. (2013). Phenolic composition of skins from four Carmenet grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *LWT–Food Sci. Technol.*, 54, 404-413.
- Ohamaa, H.;** Ikeda, H. y Moriyamab, H. (2006). Health foods and foods with health claims in Japan. *Toxicology*, 221, 95–111.
- Paixão, N.;** Perestrelo, R.; Marques, J.C. y Câmara, J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.*, 105, 204-214.
- Panceri, C.P.;** Gomes, T.M.; DE Gois, J.S.; Borges, D.L.G. y Bordignon-Luiz, M. (2013). Effect of dehydration process on mineral content, phenolic compounds and antioxidant activity of Cabernet Sauvignon and Merlot grapes. *Food Res. Int.*, 54, 1343–1350.

- Papagiannopoulos, M.;** Wollseifen, H.R.; Mellenthin, A.; Haber, B. y Galensa, R. (2004). Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MSn. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (12), 3784–3791.
- Parhiz, H.;** Roohbakhsh, A.; Soltani, F.; Rezaee, R. y Iranshahi, M. (2015). Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytother. Res.*, 29, 323–331
- Pérez-Lamela, C.;** García-Falcon, M.S.; Simal-Gandara, J.; Orriols-Fernández, I. (2007). Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chem.*, 101 (2), 601–606.
- Perrón, N.R.;** García, C.R.; Pinzon, J.R.; Chaur, M.N. y Brumaghim, J.L. (2011). Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage. *J. Inorg. Biochem.*, 105, 745–753.
- Petti, S. y Sculli, C.** (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *J. Dent.*, 37, 413–423.
- Pietta, P.;** Simonetti, P.; Gardana, C. y Mauri, P. (2000). Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of *Ginkgo biloba* flavonol and *Camellia sinensis* catechin metabolites. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23, 223–226.
- Pinelo, M.;** Arnous, A. y Meyer, A.S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 579–590.
- Piñeiro, Z.;** Palma, M. y Barroso, C.G. (2004). Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. *J. Chromatogr. A.*, 1026, 19–23.
- Poli, G.;** Sottero, B.; Gargiulo, S. y Leonarduzzi, G. (2009). Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. *Mol. Aspects Med.*, 30, 180–189.
- Polovka, M.;** Št'áviková, L.; Hohnová, B.; Karásek, P. y Roth, M. (2010). Offline combination of pressurized fluid extraction and electron paramagnetic resonance spectroscopy for antioxidant activity of grape skin extracts assessment. *J. Chromatogr. A.*, 1217, 7990–8000
- Pompeu, D. R.;** Silva, E. M. y Rogez, H. (2009). Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. *Bioresour. Technol.*, 100, 6076–6082.
- Prasain, J.K.;** Peng, N.; Dai, Y.; Moore, R.; Arabshahi, A.; Wilson, L.; Barnes, S.; Wyss, J.M.; Kim, H. y Watts, R. (2009). Liquid chromatography tandem mass spectrometry identification of proanthocyanidins in rat plasma after oral administration of grape seed extract. *Phytomedicine*, 16, 233–243.
- Prodanov, M.;** Vacas, V.; Hernández, T.; Estrella, I.; Amador, B. y Winterhalter, P. (2013). Chemical characterisation of Malvar grape seeds (*Vitis vinifera* L.) by ultrafiltration and RP-HPLC-PAD-MS. *J. Food Compos. Anal.*, 31, 284–292.

Pronyk, C. y Mazza, G. (2009). Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. *J. Food Eng.*, 95, 215-226.

Proteggente, A.R.; Pannala, A.S.; Paganga, G.; Van Buren, L.; Wagner, E.; Wiseman, S.; Van de Put, F.; Dacombe, C. y Rice-Evans, C.A. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Res.*, 36, 217-233.

Pulido, R.; Bravo, L. y Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3396-3402.

Püssa, T.; Floren, J.; Kuldkepp, P. y Raal, A. (2006). Survey of Grapevine *Vitis vinifera* Stem Polyphenols by Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7488-7494.

Rastija, V.; Srečnik, G. y Medić-Šarić, M. (2009). Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chem.*, 115, 54-60.

Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A. y Dubourdieu, D. (2006). Handbook of Enology: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments, second ed. John Wiley & Sons Ltd., West, Sussex, England.

Rosenblat, M.; Volkova, N.; Attias, J.; Mahamid, R. y Aviram, M. (2010). Consumption of polyphenolic-rich beverages (mostly pomegranate and black currant juices) by healthy subjects for a short term increased serum antioxidant status, and the serum's ability to attenuate macrophage cholesterol accumulation. *Food Funct.*, 1, 99-109.

Ryan, L. y Prescott, S.L. (2010). Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an in vitro digestion. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 45, 1191-1197.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Bio. Med.* 26, 1231-1237.

Rebelo, M.J.; Rego, R.; Ferreira, M. y Oliveira M.C. (2013). Comparative study of the antioxidant capacity and polyphenol content of Douro wines by chemical and electrochemical methods. *Food Chem.*, 141, 566-573.

Record, I.R. y Lane, J.M. (2001). Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chem.*, 73, 481-486.

Rendeiro, C.; Guerreiro, J.D.T.; Williams, C.M. y Spencer, J.P.E. (2012). Flavonoids as modulators of memory and learning: molecular interactions resulting in behavioural effects. *P. Nutr. Soc.*, 71, 246-262.

Revilla, I.; Pérez-Magariño, S.; González-SanJosé, M.L.; Beltrán, S. (1999). Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.*, 847, 83-90.

Rifici, V.A.; Schneider, S.H. y Khachadurian, A.K. (2002). Lipoprotein Oxidation Mediated by J774 Murine Macrophages Is Inhibited by Individual Red Wine Polyphenols but Not by Ethanol. *J. Nutr.*, 132, 2532–2537.

Rockenbach, I.I.; Da Silva, G.L.; Rodrigues, E.; Kuskoski, E.M. y Fett, R. (2008). Influência do solvent no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extractos de bagaço de uva (*Vitis vinífera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciencia Tecnol. Aliment.*, 238-244.

Rockenbach, I.I.; Gonzaga, L.V.; Rizelio, V.M.; Gonçalves, A.E.S.S.; Genovese, M.I.; Fett, R. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinífera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Res. Int.*, 44, 897–901.

Roggero, J.P.; Coen, S. y Ragonnet, B. (1986). High-performane liquid-cromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah – an approach to anthocyanin metabolism. *Am. J. of Enol. Viticult.*, 37, 77-83.

Ruberto, G.; Renda, A.; Daquino, C.; Amico, V.; Spatafora, C.; Tringali, C. y De Tommasi, N. (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chem.*, 100, 203-210.

Ruggieri, L.; Cadena, E.; Martínez-Blanco, J.; Gasol, C.M.; Rieradevall, J.; Gabarrell, X.; Gea, T.; Sort, X. y Sánchez, A. (2009). Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process. *J. Clean. Prod.*, 17 (9), 830-838.

Sahpazidou, D.; Geromichalos, G.D.; Stagos, D.; Apostolou, A.; Haroutounian, S.A.; Tsatsakis, A.M.; Tzanakakis, G.M.; Wallace Hayes, A y Kouretas, D. (2014). Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. *Toxicol. Lett.*, 230(2), 218-224.

Sakanaka, S.; Juneja, L.R. y Taniguchi, M. (2000). Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*, 90, 81–85.

Sakuraia, T.; Kitadateb, K.; Nishiokab, H.; Fujiib, H.; Kizakia, T.; Kondohc, Y.; Izawad, T.; Ishidae, H.; Radák, Z y Ohnoa, H. (2010). Oligomerized grape seed polyphenols attenuate inflammatory changes due to antioxidative properties in coculture of adipocytes and macrophages. *J. Nutr. Biochem.*, 21, 47–54.

Sano, A.; Uchida, R.; Saito, M.; Shioya, N.; Komori, Y.; Tho, Y. y Hashizume, N. (2007). Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 53, 174–182.

Schiever, A.; Stintzing, F.C. y Carle, R (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends Food Sci. Technol.*, 12, 401-413.

Šegura, M.; Novak, I. y Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem.*, 124, 1208-1216.

Sen, I. y Tokalti, F. (2014). Authenticity of wines made with economically important grape varieties grown in Anatolia by their phenolic profiles. *Food Control*, 46, 446-454.

Serra, A.; Macia, A.; Romero, M.-P.; Valls, J.; Blade, C.; Arola, L. y Motilva, M.-J. (2010). Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in in vitro and in vivo models. *Br. J. Nutr.*, 103, 944-952.

Silva, E.M.; Rogez, H. y Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolic from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.*, 55, 381-387.

Singleton, V.L.; Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Method. Enzymol.*, 299, 152-178.

Siracusa, L.; Kulisic-Bilusic, T.; Politeo, O.; Krause, I.; Dejanovic, B. y Ruberto, G. (2011). Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Aqueous Infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after Submission to a Two-Step in Vitro Digestion Model. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 12453-12459.

Siró, I.; Kápolna, E.; Kápolna, B. y Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. A review. *Appetite*, 51, 456-467.

Souquet, J.M.; Labarbe, B.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.Y. y Moutounet, M. (2000). Phenolic Composition of Grape Stems. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (4): 1076-1080.

Spencer, J.P.E.; Schroeter, H.; Shenoy, B.; Srai, K.S.; Debnam, E.S. y Rice-Evans, C. (2001). Epicatechin Is the Primary Bioavailable Form of the Procyanidin Dimers B2 and B5 after Transfer across the Small Intestine. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 285, 588-593.

Spranger, I.; Sun, B.S.; Mateus, A.M.; de Freitas, V. y Ricardo-da-Silva, A.M. (2008). Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chem.*, 108, 519-532.

Št'avíková, L.; Polovka, M.; Hohnová, B.; Karásek, P. y Roth, R. (2011). Antioxidant activity of grape skin aqueous extracts from pressurized hot water extraction combined with electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Talanta*, 85, 2233-2240.

Stalmach, A.; Edwards, C.A.; Wightman, J.D. y Crozier, A. (2012). Gastrointestinal stability and bioavailability of (poly)phenolic compounds following ingestion of Concord grape juice by humans. *Mol. Nutr. Food Res.*, 56, 497-509.

Steinbrecher, U.P. (1987). Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products., *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 3603-3608.

Sun, B.; Leandro, C.; Ricardo-da-Silva, J.M. y Spranger, M.I. (1998). Separation of Grape and Wine Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1390-1396.

- Sun., B.;** Ricardo-da-Silva, J.M. y Spranger, M.I. (2001). Quantification of catechins and proanthocyanidins in several portuguese grapevine varieties and red wines. *Ciência Téc. Vitiv.*, 16, 23-34.
- Sun., B.** y Spranger, M.I. (2005). Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. *Ciência Téc. Vitiv.*, 20 (2), 59-89.
- Sun, B.;** de Sá, M.; Leandro, C.; Caldeira, I.; Duarte, F. y Spranger, I. (2013). Reactivity of Polymeric Proanthocyanidins toward Salivary Proteins and Their Contribution to Young Red Wine Astringency. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 939–946.
- Tabart, J.;** Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.O. y Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.*, 113, 1226-1233.
- Tagliazucchi, D.;** Verzelloni, E.; Bertolini, D. y Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem.*, 120, 599–606.
- Takashiba, S.;** Van Dyke, T.E.; Amar, S.; Murayama, Y.; Soskolne, A.W. y Shapira, L. (1999). Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor-κB. *Infect. Immun.*, 67, 5573-5578.
- Takayanagi, T.;** Okuda, T.; Mine, Y. y Yokotsuka, K. (2004). Induction of resveratrol biosynthesis in skins of three grape cultivars by ultraviolet irradiation. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 73, 193-199.
- Tanveer, A.;** Farooq, U.; Akram, K.; Hayat, Z.; Shafi, A.; Nazar, H. y Ahmad, Z. (2015). Pomegranate Extracts: A Natural Preventive Measure against Spoilage and Pathogenic Microorganisms. *Food Rev. Int.*, 31, 29–51.
- Tatsuno, T.;** Jinno, M.; Arima, Y.; Kawabata, T.; Hasegawa, T.; Yahagi, N.; Takano, F. y Ohtaa, T. (2012). Anti-inflammatory and Anti-melanogenic Proanthocyanidin Oligomers from Peanut Skin. *Biol. Pharm. Bull.*, 35 (6), 909–916.
- Tedeschi, E.;** Suzuki, H. y Menegazzi, M. (2002). Antiinflammatory action of EGCG, the main component of tea, through STAT-1 inhibition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 973, 435-437.
- Teixeira, A.;** Baenas, N.; Domínguez-Perles, R.; Barros, A.; Rosa, E.; Moreno, D.A. y García-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 15638-15678.
- Toaldo, I.M.;** Fogolari, O.; Pimentel, G.C.; de Gois, J.S.; Borges, D.L.G.; Caliari, V. y Bordignon-Luiz, M. (2013). Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L. *LWT - Food Sci. Technol.*, 53, 1-8.
- Tomé-Carneiro, J.;** Larrosa, M.; Yáñez-Gascón, M.J.; Dávalos, A.; Gil-Zamorano, J.; González, M.; García-Almagro, F.J.; Ruiz Ros, J.A.; Tomás-Barberán, F.A.; Espín, J.C. y García-Conesa, M.T. (2013). One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. *Pharmacol Res.*, 72, 69-82.

Tourtoglou, C.; Nenadis, N. y Paraskevopoulou, A. (2014). Phenolic composition and radical scavenging activity of commercial Greek white wines from *Vitis vinifera* L. cv. Malagousia. *J. Food Compos. Analysis*, 33 166–174.

Vaidyanathan, J.B. y Walle, T. (2003). Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)-epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 307, 745-752.

Varoni, E.M.; Vitalini, S.; Contino, D.; Lodi, G.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Sardella, A.; Carrassi, A. y Iriti, M. (2013). Effects of red wine intake on human salivary antiradical capacity and total polyphenol content. *Food Chem. Toxicol.*, 58, 289–294.

Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Troncoso, A.M. y García-Parrilla, M.C. (2004). The antioxidant activity of wines determined by the ABTS •+ method: influence of sample dilution and time. *Talanta*, 64, 601-09.

Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Troncoso, A.M. y García-Parrilla, M.C. (2006). Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chem.*, 95, 394-404.

Vivancos, M y Moreno, J.J. (2008). Effect of resveratrol, tyrosol and β -sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *Br. J. Nutr.*, 99, 1199–120.

Vrček, I.V.; Bojić, M.; Zūntar, I.; Mendaš, G. y Medić-Šarić, M. (2011). Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chem.*, 124, 354–361.

Wijngaard, H.; Hossain, M.B.; Rai, D.K. y Brunton, N. (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Res. Int.*, 46, 505-513.

Wootton-Beard, C.P.; Moran, A. y Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Res. Int.*, 44, 217–224.

Woraratphoka, J.; Intarapichet, K.O. y Indrapichate, K. (2007). Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand. *Food Chem.*, 104, 1485-1490.

Xiang, L.; Xiao, L.; Wanga, Y.; Li, H.; Huang, Z. y He, X. (2014). Health benefits of wine: Don't expect resveratrol too much. *Food Chem.*, 156, 258–263.

Xu, F.; Luan, L.Y.; Zhang, Z.-W.; Huo, S.-S.; Gao, X.; Fang, Y.-L. y Xi, Z.-M. (2014). Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Young Wines Made from Yan73 (*Vitis vinifera* L.) and Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) Grapes Treated by 24-Epibrassinolide. *Molecules*, 19, 10189-10207.

Xu, C.; Zhang, L.; Cao, L. y Lu, J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chem.*, 119, 1557–1565.

Yancey, P.G. y Jerome, W.G. Lysosomal sequestration of free and esterified cholesterol from oxidized low density lipoprotein in macrophages of different species. *J. Lipid Res.*, 39, 1349-1361.

Yang, J.; Martinson, T.E. y Liu, R.H. (2009) Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chem.*, 116, 332-339.

Yemis, O.; Bakkalbasi, E. y Artik, N. (2008). Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts obtained from different varieties grown in Turkey. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 43, 154-159.

Yilmaz, Y. y Toledo, R.T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 41-48.

Yoshino, K.; Suzuki, M.; Sasaki, K.; Miyase, T. y Sano, M. (1999). Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. *J. Nutr. Biochem.*, 10, 223-229.

Zhang, A.; Fang, Y.; Wang, H.; Li, H. y Zhang, Z. (2011). Free-Radical Scavenging Properties and Reducing Power of Grape Cane Extracts from 11 Selected Grape Cultivars Widely Grown in China. *Molecules*, 16, 10104-10122.

Zhou, H.; Yuan, Q. y Lu, J. (2011). Preparative separation of punicalin from waste water of hydrolysed pomegranate husk by macroporous resin and preparative high-performance liquid chromatography. *Food Chem.*, 126, 3, 1361-1365

Zhu, Q.Y.; Holt, R.R.; Lazarus, S.A.; Ensunsa, J.L.; Hammerstone, J.F.; Schmitz, H.H. y Keen, C.L. (2002). Stability of the Flavan-3-ols Epicatechin and Catechin and Related Dimeric Procyanidins Derived from Cocoa. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1700-170

ANEXOS

Tabla A.1. Valores TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de las uvas blancas de la añada 2007.

	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANÓLICO
AL	2,23 ± 0,71 ^{a*}	10,13 ± 5,17 ^c
CB	5,97 ± 0,71 ^c	12,62 ± 0,63 ^d
CH	1,57 ± 0,05 ^a	2,84 ± 0,83 ^{ab}
GB	7,15 ± 2,43 ^d	16,83 ± 3,16 ^e
MA	1,13 ± 0,09 ^a	2,09 ± 0,66 ^{ab}
MC	1,37 ± 0,15 ^a	2,58 ± 0,6 ^{ab}
PA	1,19 ± 0,06 ^a	1,82 ± 0,33 ^a
SB	1,80 ± 0,23 ^a	3,28 ± 1,68 ^{ab}
VG	4,43 ± 0,26 ^b	17,03 ± 0,79 ^e
XA	1,75 ± 0,05 ^a	4,59 ± 0,72 ^b

*Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tabla A.2. Valores TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de las uvas blancas de la añada 2008.

	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANÓLICO
AL	9,12 ± 1,43 ^{c*}	36,07 ± 5,51 ^f
CB	7,90 ± 0,81 ^{bc}	23,92 ± 1,88 ^d
CH	14,78 ± 3,19 ^d	30,62 ± 3,58 ^e
GB	13,94 ± 0,97 ^d	16,07 ± 0,84 ^c
MA	1,76 ± 0,30 ^a	2,36 ± 0,79 ^a
MC	0,92 ± 0,04 ^a	1,01 ± 0,03 ^a
PA	6,47 ± 0,70 ^b	7,30 ± 1,59 ^b
SB	2,56 ± 0,19 ^a	5,59 ± 0,98 ^b
VG	14,07 ± 2,69 ^d	47,05 ± 0,97 ^g
XA	2,08 ± 0,5 ^a	8,65 ± 0,48 ^b

*Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tabla A.3. Contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos acuosos y etanólicos de las uvas blancas de la añada 2007.

	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANÓLICO
AL	237,36 ± 84,28 ^{a*}	852,18 ± 365,67 ^b
CB	577,82 ± 21,79 ^c	1153,26 ± 132,42 ^c
CH	156,58 ± 5,32 ^a	331,49 ± 93,54 ^a
GB	660,19 ± 207,99 ^c	1204,45 ± 210,16 ^c
MA	146,44 ± 12,44 ^a	249,39 ± 99,97 ^a
MC	185,85 ± 10,81 ^a	316,62 ± 80,13 ^a
PA	124,01 ± 22,30 ^a	181,61 ± 15,80 ^a
SB	224,81 ± 14,88 ^a	331,92 ± 144,68 ^a
VG	364,40 ± 22,28 ^b	1345,21 ± 11,02 ^c
XA	175,49 ± 4,13 ^a	419,42 ± 51,00 ^a

*Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tabla A.4. Contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos acuosos y etanólicos de las uvas blancas de la añada 2008.

	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANÓLICO
AL	752,72 ± 76,92 ^{b*}	2872,93 ± 256,94 ^f
CB	702,22 ± 10,92 ^b	1871,25 ± 127,35 ^d
CH	1161,27 ± 119,54 ^c	2542,80 ± 324,09 ^e
GB	1149,16 ± 20,34 ^c	1623,33 ± 32,38 ^d
MA	161,91 ± 50,92 ^a	226,20 ± 91,02 ^a
MC	89,52 ± 5,05 ^a	90,62 ± 4,88 ^a
PA	618,94 ± 23,57 ^b	835,6 ± 192,10 ^b
SB	251,09 ± 29,95 ^a	551 ± 39,74 ^b
VG	1323,89 ± 391,75 ^c	3541,86 ± 61,41 ^g
XA	185,76 ± 40,08 ^a	1274,81 ± 51,94 ^c

*Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tabla A.5. Valor TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de las uvas tintas de la añada 2007.

	EXTRACTO ACUOSO			EXTRACTO ETANÓLICO		
BE	14,15	±	2,12 ^{e*}	34,89	±	3,15 ^f
BO	4,75	±	0,57 ^{abc}	13,33	±	0,26 ^a
CA	6,16	±	0,05 ^c	25,43	±	0,73 ^c
CI	4,70	±	1,14 ^{abc}	43,93	±	1,77 ^h
CF	6,80	±	1,23 ^c	37,91	±	2,25 ^g
GA	10,03	±	1,91 ^d	39,45	±	1,77 ^g
GN	3,39	±	0,12 ^a	12,07	±	0,14 ^a
ME	20,46	±	1,90 ^f	43,87	±	1,05 ^h
MT	14,04	±	1,16 ^e	45,89	±	2,07 ^h
PN	5,85	±	0,77 ^{bc}	31,49	±	0,64 ^e
SH	16,00	±	0,99 ^e	28,64	±	1,31 ^d
TA	11,81	±	1,09 ^d	37,32	±	3,38 ^g
TE	4,94	±	0,49 ^{abc}	38,09	±	0,61 ^g
TN	3,64	±	0,67 ^{ab}	34,38	±	2,05 ^f
VAR1	14,91	±	0,85 ^e	25,00	±	0,77 ^c
VAR4	31,75	±	5,72 ^g	62,82	±	1,58 ⁱ
VAR8	10,55	±	2,39 ^d	23,86	±	4,13 ^c
ZF	5,66	±	1,72 ^{abc}	20,79	±	0,56 ^b

*Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tabla A.6. Valor TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de las uvas tintas de la añada 2008.

	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETANÓLICO
BE	17,01 ± 6,55 ^{fg*}	39,73 ± 0,56 ^{ef}
BO	13,14 ± 0,11 ^{def}	25,37 ± 0,45 ^{bc}
CA	3,60 ± 0,15 ^{ab}	24,81 ± 1,54 ^{bc}
CI	3,04 ± 0,50 ^a	15,19 ± 0,43 ^a
CF	15,00 ± 2,15 ^{efg}	40,83 ± 10,22 ^f
GA	22,23 ± 7,36 ^{hi}	50,95 ± 1,10 ^{hi}
GN	10,16 ± 3,30 ^{cd}	33,57 ± 2,07 ^{de}
ME	10,68 ± 1,83 ^{cde}	27,86 ± 1,59 ^{cd}
MT	34,33 ± 0,60 ^k	57,45 ± 1,19 ^{ij}
PN	7,54 ± 0,35 ^{bc}	43,18 ± 1,97 ^{fg}
SH	12,29 ± 0,82 ^{de}	18,86 ± 0,22 ^{ab}
TA	19,19 ± 3,10 ^{gh}	87,29 ± 12,46 ^l
TE	12,72 ± 1,53 ^{def}	43,30 ± 1,43 ^{fg}
TN	13,79 ± 0,06 ^{def}	52,44 ± 7,30 ^{hi}
VAR1	23,68 ± 0,51 ⁱ	48,39 ± 2,41 ^{gh}
VAR4	28,89 ± 1,72 ^j	59,46 ± 7,36 ^j
VAR8	38,35 ± 0,95 ^l	68,04 ± 0,93 ^k
ZF	4,71 ± 3,27 ^{ab}	22,10 ± 1,45 ^{abc}

*Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tabla A.7. Contenido de compuestos fenólicos totales de extractos acuosos y etanólicos de las uvas tintas de la añada 2007.

	EXTRACTO ACUOSO			EXTRACTO ETANÓLICO		
BE	1245,86	±	275,90 ^{cd*}	3412,77	±	31,37 ^{fg}
BO	582,36	±	70,31 ^{ab}	1476,22	±	60,54 ^a
CA	602,73	±	41,02 ^{ab}	2562,77	±	89,56 ^{cd}
CI	438,54	±	117,62 ^a	3850,73	±	133,89 ^{hi}
CF	667,02	±	124,44 ^{ab}	3417,24	±	360,30 ^{fg}
GA	1032,30	±	231,75 ^{bcd}	3149,43	±	115,56 ^{ef}
GN	362,84	±	30,65 ^a	1152,30	±	53,50 ^a
ME	1690,66	±	71,00 ^e	4240,44	±	49,42 ⁱ
MT	1146,01	±	143,7 ^{cd}	3333,04	±	384,41 ^{fg}
PN	1149,76	±	606,34 ^{cd}	2103,68	±	475,02 ^b
SH	1327,68	±	314,38 ^{de}	2802,95	±	82,51 ^{de}
TA	1308,33	±	81,36 ^{de}	3753,52	±	779,02 ^{gh}
TE	809,27	±	89,61 ^{abc}	3257,66	±	139,71 ^f
TN	501,86	±	228,79 ^a	2978,81	±	129,58 ^{def}
VAR1	1014,93	±	235,30 ^{bcd}	2305,66	±	414,88 ^{bc}
VAR4	2469,38	±	765,28 ^f	4657,80	±	240,44 ^j
VAR8	1011,94	±	275,91 ^{bcd}	2019,80	±	207,38 ^b
ZF	571,06	±	118,51 ^{ab}	2146,59	±	147,50 ^{bc}

*Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tabla A.8. Contenido de compuestos fenólicos totales de extractos acuosos y etanólicos de las uvas tintas de la añada 2008.

	EXTRACTO ACUOSO			EXTRACTO ETANÓLICO		
BE	1258,09	±	407,74 ^{e*}	3165,89	±	105,24 ^{efg}
BO	1013,07	±	57,85 ^{cde}	2176,28	±	71,56 ^{bc}
CA	309,73	±	58,67 ^a	2129,77	±	88,70 ^{bc}
CI	295,81	±	54,36 ^a	1198,31	±	34,86 ^a
CF	1088,67	±	89,64 ^{cde}	2611,20	±	311,48 ^{cde}
GA	1684,87	±	375,21 ^f	3720,96	±	156,18 ^{gh}
GN	877,98	±	218,06 ^{cd}	2597,18	±	94,05 ^{def}
ME	882,88	±	162,53 ^{cd}	2289,94	±	396,44 ^{bcd}
MT	2812,19	±	77,93 ^h	4170,19	±	151,08 ^{hij}
PN	780,00	±	18,98 ^{bc}	3296,31	±	187,26 ^{fg}
SH	1097,54	±	112,12 ^{cde}	1715,25	±	127,58 ^{ab}
TA	1901,99	±	549,55 ^f	7420,94	±	1767,2 ^k
TE	1095,81	±	198,89 ^{cde}	3487,18	±	67,13 ^{fg}
TN	1178,77	±	93,87 ^{de}	3800,94	±	325,39 ^{ghi}
VAR1	1997,68	±	98,98 ^f	3610,30	±	342,25 ^{gh}
VAR4	2389,83	±	384,68 ^g	4422,25	±	567,74 ^{ij}
VAR8	3383,44	±	316,58 ⁱ	4767,34	±	392,99 ^j
ZF	503,73	±	170,05 ^{ab}	1961,13	±	176,54 ^{bc}

*Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

